

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Monika Lazarová

Úloha proteinu Whi3p při mitóze u *Saccharomyces cerevisiae*

The role of Whi3p in mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Michaela Schierová, Ph.D

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 23.08.2017

Podpis

Děkuji vedoucí mé práce RNDr. Michaele Schierové, Ph.D za trpělivost a pečlivost, se kterou k vedení mé práce přistupovala, a také za cenné rady, jež mi dávala. Dále bych ráda poděkovala své rodině za podporu při celém studiu.

Obsah

Obsah.....	iv
Seznam použitých zkratk.....	v
Abstrakt.....	vi
1 Úvod	1
2 Struktura a funkce Whi3p	3
2.1 Struktura proteinu Whi3p	4
2.2 Whi3p jako regulátor G1/S přechodu	5
2.3 Whi3p jako regulátor ploidie	7
2.3.1 Whi3p negativně reguluje expresi genů, které jsou součástí kohesinu	7
2.3.2 Whi3p pozitivně reguluje expresi <i>NIP100</i>	8
2.4 Úloha Whi3p při mitotickém dělení kvasinek	9
3 Dělicí vřeténko a jeho dynamika	11
3.1 Struktura dělicího vřeténka u kvasinek	11
3.2 Dynamika dělicího vřeténka	11
3.2.1 Molekulární motory.....	12
3.2.2 Dynaktinový komplex	14
3.2.3 Ukotvení dělicího vřeténka	16
3.3 Model „klouzání mikrotubulů“	20
4 Kontrola anafáze	21
4.1 Fosfatáza Cdc14p	21
4.2 Regulace průběhu mitózy v časně anafázi	23
4.2.1 Kontrola separace sesterských chromatid a zahájení anafáze	23
4.2.2 FEAR.....	24
4.3 Regulace průběhu mitózy v pozdní anafázi	25
4.3.1 Vliv polohy dělicího vřeténka - SPOC.....	25
4.3.2 MEN	27
5 Závěr	30
6 Seznam použité literatury	31

Seznam použitých zkratek

APC	anaphase promoting complex	komplex aktivující anafázi
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
CC1, CC2	Num1p coil-coiled domain	strukturní domény Num1p
CRR	Cdc28p-recruitment region	strukturní doména pro vazbu Cdc28p
dSPB	daughter spindle pole body	dceřiné pólové tělísko
ER	endoplasmatic reticulum	endoplasmatické retikulum
FEAR	Cdc fourteen early anaphase release	signální dráha na počátku anafáze vedoucí k uvolnění Cdc14p
GAP	GTPase-activating protein	GTPázu aktivující protein
GFP	green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
MCC	mitotic checkpoint complex	komplex mitotického kontrolního bodu
m-CDK	mitotic cyclin-dependent kinase	mitotická cyklin-dependentní kináza
MEN	Mitotic exit network	signální dráha vedoucí k ukončení mitózy
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
mSPB	maternal spindle pole body	mateřské pólové tělísko
NLS	nuclear localization sequence	jaderný lokalizační signál
ORF	open reading frame	čtecí rámec
PA	patch assembly domain	strukturní doména Num1p
PH	pleckstrin homology domain	strukturní doména Num1p
PolyQ	polyglutamin sequence	oblast bohatá na Glutamin
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
RRM	RNA-recognition motif	strukturní doména Whi3p pro vazbu mRNA cílových proteinů
SAC	Spindle assembly checkpoint	kontrolní bod sestavení dělicího vřeténka
SPB	spindle pole body	pólové tělísko
SPOC	Spindle position checkpoint	kontrolní bod polohy dělicího vřeténka
YFP	yellow fluorescent protein	žlutý fluorescenční protein

Zkratky důležitých proteinů viz Tab. 1 (Str. 10).

Abstrakt

RNA vazebný protein Whi3p v kvasinkové buňce ovlivňuje celou řadu dějů, z nichž nejvýznamnější je regulace velikosti kvasinkové buňky při vstupu do S fáze. V nedávné době byla objevena souvislost mezi proteinem Whi3p a ploidí kvasinkové buňky. Bylo prokázáno, že v kmenech s absencí genu *WHI3* (*whi3Δ*) dochází ke zvýšení ploidie. Protein Whi3p totiž ovlivňuje expresi genů kódujících podjednotky kohezinu a rovněž reguluje hladinu Nip100p na posttranskripční úrovni. Nip100p je důležitou součástí dynaktinového komplexu. Obě možnosti regulace úzce souvisejí se správným rozchodem chromozómů v průběhu anafáze mitotického dělení. Microarrayové a imunoprecipitační analýzy prokazují interakci Whi3p s více než 400 mRNA. Translací těchto cílových mRNA vznikají strukturní i regulační proteiny esenciální pro standardní průběh jaderného dělení. Konkrétní důsledky interakcí Whi3p s cílovými RNA nejsou známy, nicméně poukazují na dosud neznámou úlohu proteinu Whi3p při mitotickém dělení pučících kvasinek.

Klíčová slova: Whi3p, RNA vazebný protein, dynaktinový komplex, regulační mechanismy v anafázi, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

RNA binding protein Whi3p in the yeast cell affects a variety of processes, the most important is the regulation of the yeast cell size when entering the S phase. Recently, a link between Whi3p protein and yeast cell ploidy has been discovered. It has been shown that in strains lacking the *WHI3* gene (*whi3Δ*) there is an increase in ploidy. The Whi3p protein affects the expression of genes coding cohesin subunits and also regulates an amount of Nip100p on the post-transcriptional level. Nip100p is an important part of the dynactin complex. Both possibilities of regulation are closely related to the correct chromosome distribution during anaphase of the mitotic division. Microarray and immunoprecipitation analyzes demonstrate Whi3p interaction with more than 400 mRNAs. By translating these target mRNAs both structural and regulatory proteins, that are essential for the standard course of nuclear division, are formed. The specific consequences of Whi3p interactions with target RNAs are not known, however, they point to the unknown role of Whi3p protein in the mitotic division of budding yeast.

Key words: Whi3p, RNA binding protein, dynactin complex, regulatory principles in anaphase, *Saccharomyces cerevisiae*

1 Úvod

Mitóza je mechanismus jaderného dělení, který zajišťuje rozdělení buňky na dvě geneticky identické kopie. U kvasinek tento proces probíhá bez rozpadu jaderné membrány, takzvanou uzavřenou mitózou. U pučících kvasinek jsou pro rovnoměrnou distribuci genetické informace mezi mateřskou a dceřinou buňkou významné především děje v anafázi mitotického dělení, které jsou zodpovědné za průnik chromozomů úzkým krčkem pupenu. Anafáze se obecně dělí na tzv. anafázi A, ve které dochází k rozchodu sesterských chromatid k pólům dělicího vřeténka v důsledku depolymerizace kinetochorových mikrotubulů, a na anafázi B, ve které dochází k prodlužování dělicího vřeténka a tím k oddalování pólů v rámci dělicí se buňky.

Mitóza u kvasinek je stále intenzivně studovaný děj, ačkoli její základní principy byly odhaleny již před dvaceti lety. Pokročilé analytické metody a elektronová mikroskopie dnes umožňují například vytváření 3D modelů nebo analýzu kvasinkového mitotického proteomu a jeho další studium. Jelikož je pučící kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* eukaryotickým modelovým organismem, odhalení funkcí jednotlivých proteinů při mitotickém dělení *S. cerevisiae* významně přispívá k pochopení podobných biologických procesů u vyšších eukaryot. V současné době se výzkum mitotického dělení kvasinek zabývá především studiem regulačních drah a kontrolních bodů mitózy.

Analýzou interakcí genů a proteinů podílejících se na mitotickém dělení *S. cerevisiae* bylo zjištěno, že některé RNA genů, které jsou součástí kontrolních bodů a regulačních drah anafáze nebo ovlivňující dynamiku dělicího vřeténka, interagují s RNA vazebným proteinem Whi3p, který hraje důležitou roli zejména při regulaci velikosti dělicí se kvasinkové buňky (Colomina *et al.*, 2008; Holmes *et al.*, 2013). Schladebeck & Mösch (2013) některé ze zmíněných interakcí potvrdili, když zjistili, že Whi3p ovlivňuje ploidii kvasinek na základě regulace exprese genů součástí kohezinu nebo interakcí s mRNA genu *NIP100*, jehož produkt je součástí dynaktinového komplexu. Protein Whi3p pravděpodobně ovlivňuje i hladinu regulačních proteinů, které jsou součástí regulačních drah FEAR (Cdc fourteen early anaphase release), MEN (Mitotic exit network) a kontrolních bodů SAC (Spindle assembly checkpoint) a SPOC (Spindle position checkpoint).

Cíle práce:

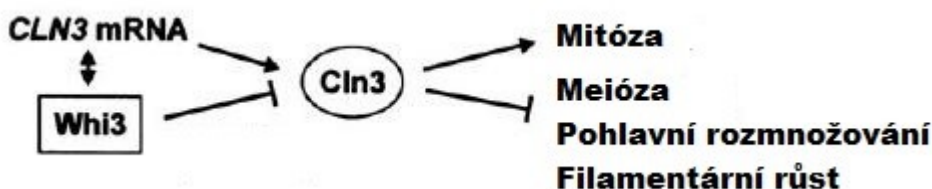
Cílem této práce je shrnout dosud známe funkce genu *WHI3* v buněčném cyklu pučících kvasinek a blíže popsat děje v průběhu mitotického dělení, které *WHI3* pravděpodobně ovlivňuje, jelikož prokazatelně interaguje s geny, mRNA a proteiny, jež jsou těchto dějů součástí.

2 Struktura a funkce Whi3p

Gen *WHI3* kóduje RNA vazebný protein Whi3p, který interakcí s mRNA cílových genů ovlivňuje jejich funkci na posttranskripční úrovni (Nash *et al.*, 2001). Whi3p prokazatelně interaguje se stovkami mRNA genů podílejících se například na tvorbě buněčné stěny, regulaci buněčného cyklu a transportu váčků (Colomina *et al.*, 2008; Holmes *et al.*, 2013). Analýzou kmenů s delecí *WHI3* nebo se zvýšeným počtem jeho kopií (Schladebeck & Mösch, 2013) bylo zjištěno, že Whi3p ovlivňuje filamentární růst a tvorbu biofilmů (Malcher *et al.*, 2011), sporulaci, pohlavní rozmnožování (Garí *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2001), správný růst pupenů (Colomina *et al.*, 2009), udržení ploidie (Schladebeck & Mösch, 2013) a stresovou odpověď (Holmes *et al.*, 2013).

Wang *et al.*, (2004) pomocí centrifugace v glycerolovém gradientu zjistili, že Whi3p je součástí různých vysokomolekulárních proteinových komplexů, jako je ER (endoplazmatické retikulum) nebo cytoskelet, a pomocí tandemové afinitní chromatografie prokázali interakci se chaperony Ssa1,2p. Whi3p tedy kromě výše uvedených funkcí ovlivňuje pravděpodobně i třídění proteinů určených k exocytóze (Colomina *et al.*, 2008).

Gen *WHI3* byl objeven v kvasince *S. cerevisiae* jako gen zodpovědný za kontrolu velikosti kvasinkových buněk před vstupem do S fáze. Kmeny s delecí *WHI3* vykazují tzv. *whi* fenotyp, který je charakteristický pučením buněk malé velikosti (Jorgensen *et al.*, 2002). Velikost pučících buněk Whi3p ovlivňuje interakcí s mRNA genu *CLN3*, kódujícího cyklin Cln3p, který je hlavním regulátorem přechodu z G1 do S fáze (Dirick *et al.*, 1995; Stuart & Wittenberg, 1995; Sudbery *et al.*, 1980; Tyers *et al.*, 1993). Vazbou *CLN3*-mRNA Whi3p negativně reguluje funkci cyklinu Cln3p (Garí *et al.*, 2001).



Obrázek 1: Schéma interakce Whi3p a Cln3p vedoucí k různým životním strategiím buňky. Podle (Garí *et al.*, 2001).

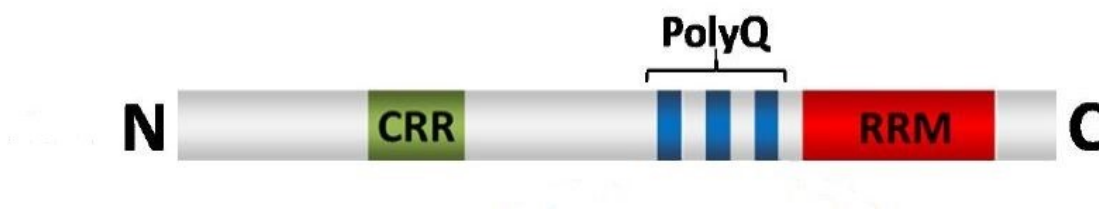
2.1 Struktura proteinu Whi3p

Ve struktuře Whi3p lze rozlišit tři specifické domény, které jsou zodpovědné za jeho funkci (Obr. 2). Nejdůležitější z nich je RRM (RNA-recognition motif). Jedná se o oblast 80-90 aminokyselin, která je zodpovědná za rozpoznání a vazbu cílové mRNA (Nash *et al.*, 2001). Sekundární strukturu RRM tvoří skládaný β -list (Maris *et al.*, 2005), který interaguje s tetranukleotidovou sekvencí GCAU přítomnou ve většině cílových mRNA Whi3p (Colomina *et al.*, 2008). Tyto tetranukleotidové sekvence se nacházejí nejčastěji v ORF (open reading frame) nebo v nekódující sekvenci na 5'konci cílových mRNA (Schladebeck & Mösch, 2013). Bylo prokázáno, že kmeny s alelou *WHI3* kódující Whi3p bez RRM motivu (*WHI3 Δ RRM*) vykazují stejný fenotyp jako kmeny s delecí celého genu *WHI3* (*whi3 Δ*). Přítomnost RRM ve struktuře Whi3p je tedy esenciální pro jeho funkci (Lee *et al.*, 2013).

Další specifickou doménou proteinu Whi3p je tzv. PolyQ sekvence bohatá na aminokyselinu glutamin. Delece této sekvence u *S. cerevisiae* nemá zásadní dopad na funkci Whi3p (Nash *et al.*, 2001). Proteiny s PolyQ sekvencí jsou charakteristické svou schopností vytvářet shluky, což je typické pro prionové proteiny. Whi3p se mezi prionové proteiny neřadí, nicméně jeho shlukování je využíváno například u mnohojaderné kvasinky *Ashbya gossypii*, která má tuto PolyQ sekvenci proteinu Whi3p velmi rozsáhlou. Shlukování Whi3p v určitých místech cytoplasmy tak umožňuje prostorově omezit translaci cílových mRNA, případně směřovat transkripty do určitých míst v buňce (Lee *et al.*, 2013).

Poslední významnou doménou v sekvenci Whi3p je tzv. CRR (Cdc28p-recruitment region), která je zodpovědná za vazbu cyklin dependentní kinázy Cdc28p. Nachází se na N konci proteinu a její hlavní funkcí (společně s RRM) je zadržení komplexu Cln3p-Cdc28p, jehož funkce je popsána níže, v cytoplasmě do pozdní G1 fáze (Wang *et al.*, 2004).

Homology Whi3p u *Schizosaccharomyces pombe* (Scw1p, Mde7p), *Drosophila melanogaster* (Couch potato protein) a *Homo sapiens* (RBPMS) mají 30%-85% sekvenční shodu a ve všech jsou přítomny výše popsané strukturní domény (Lee, 2013). Funkce těchto proteinů je u všech zmíněných organismů zcela odlišná. Jedná se tedy pouze o sekvenční homologii.



Obrázek 2: Struktura proteinu Whi3p. **CRR**- Cdc28-recruitment region, **RRM**- RNA-recognition motif, **PolyQ**- glutamin bohatá sekvence. Podle (Lee, 2013).

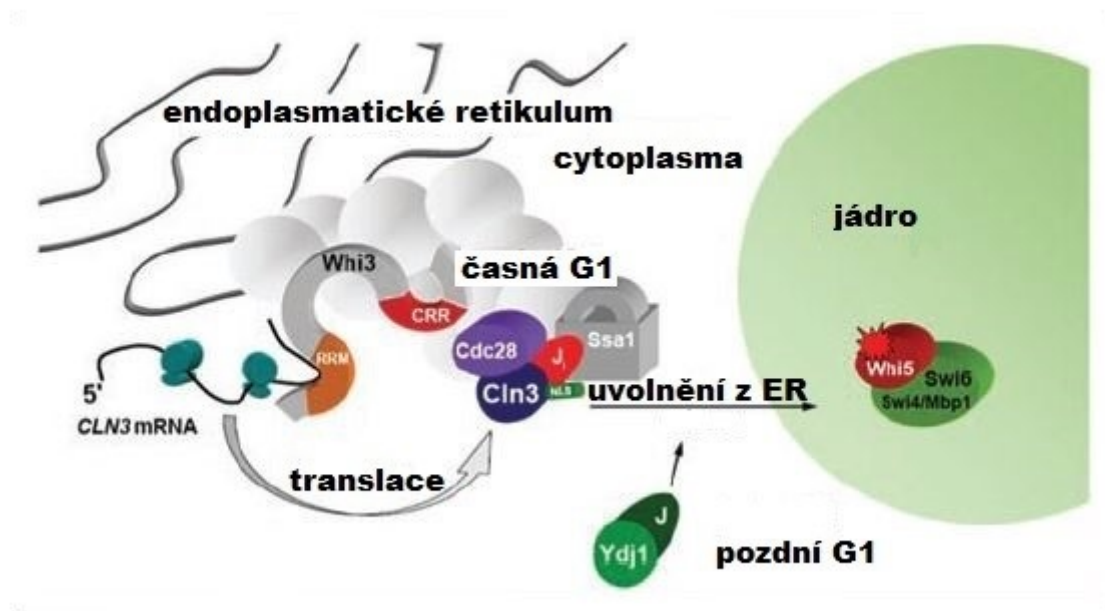
2.2 Whi3p jako regulátor G1/S přechodu

Přechod buňky do S fáze je závislý na přítomnosti komplexu Cln3p-Cdc28p v jádře, kde tento komplex spouští expresi G1 specifických genů. Přesun komplexu Cln3p-Cdc28p do jádra je zprostředkován přítomností jaderného lokalizačního signálu NLS v proteinovém řetězci cyklinu Cln3p. Cyklin dependentní kináza Cdc28p v jádře fosforyluje represor (Whi5p) transkripčních faktorů (SBF, MBF) G1 specifických genů (*CLN2*, *SWI4*, *CLB5*) pro přechod do S fáze buněčného cyklu (de Bruin *et al.*, 2004). Kdyby vstup komplexu Cln3p-Cdc28p do jádra nebyl nijak regulován, docházelo by k němu v rané G1 fázi ihned po translaci *CLN3* mRNA před dosažením optimální velikosti požadované pro dělení. V buňce tedy musí existovat mechanismus, který zabraňuje předčasnému vstupu tohoto komplexu do jádra.

Wang *et al.*, (2004) popsali úlohu proteinu Whi3p při zadržení komplexu Cln3p-Cdc28p v cytoplasmě do pozdní G1 fáze. Toto zadržení je zajištěno specifickým mechanismem, kdy protein Whi3p slouží jako lešení pro tvorbu zmíněného komplexu. Nejprve dochází k asociaci proteinu Whi3p s kinázou Cdc28p, která se nachází volně v cytoplasmě. Množství molekul Cdc28p je v buňce daleko větší než množství proteinu Whi3p, z čehož vyplývá, že i po vazbě všech molekul Whi3p s Cdc28p v cytoplasmě zůstává určité množství volných molekul Cdc28p. Dále Whi3p váže mRNA *CLN3* pomocí své RRM domény a při translaci vzniká cyklin Cln3p. Důležitým bodem v tvorbě a zadržení komplexu Cln3p-Cdc28p v cytoplasmě je správná posloupnost těchto dějů. Vzhledem k tomu, že nascentní Cln3p vzniká pouze v určitém omezeném prostoru okolo Whi3p, ke kterému byla vázaná jeho mRNA, nově vzniklý Cln3p tedy vytváří komplex s nejbližší Cdc28p, kterou je právě ta, která je vázaná na stejné molekule Whi3p. Tímto způsobem je zabráněno interakci nových molekul Cln3p s volnými molekulami Cdc28p v cytoplasmě a dochází k ukotvení komplexu Cln3p-Cdc28p k Whi3p, které je stabilní až do pozdní G1 fáze.

V případě, že by docházelo k translaci *CLN3* mRNA dříve, než k vazbě Cdc28p na Whi3p, vznikl by volný komplex Cln3p-Cdc28p, který by vstupoval do jádra již v časně G1 fázi. Podobná situace nastává i v případě chybějící RRM domény v proteinu Whi3p, kdy je *CLN3* mRNA translatována volně v cytoplasmě a Cln3p poté asociuje s volnými Cdc28p. Buňky v obou případech vykazují tzv. *whi* fenotyp. Zadržení Cln3p-Cdc28p komplexu v cytoplasmě je obecně nutné pro prodloužení G1 fáze, což umožňuje buňce nejen dosáhnout správné velikosti, ale i reagovat na vnější podmínky a volit jiné životní strategie (Wang *et al.*, 2004).

Prozatím bylo objasněno, jakým způsobem protein Whi3p přispívá k udržení komplexu Cln3p-Cdc28p v cytoplasmě. Na místě je však otázka, co je senzorem velikosti buňky, a jak dochází k uvolnění komplexu Cln3p-Cdc28p do cytoplasmy a k jeho přesunu do jádra. Bylo prokázáno, že komplex Cln3p-Cdc28p asociuje s ER, a to nejen pomocí Whi3p, ale také pomocí chaperonů Ssa1,2p (HSP70), jejichž ATPázová aktivita je inhibována přítomností inhibiční domény J_i na Cln3p (Walsh *et al.*, 2004). Inhibované Ssa1,2p udržují Cln3p-Cdc28p na ER. K jeho uvolnění je nutná konformační změna obou chaperonů, která je vyvolána jejich aktivací. V buňce je přítomen chaperon Ydj1p (HSP40), který je svou tzv. J doménou schopen aktivovat chaperony Ssa1,2p. Hladina Ydj1p v buňce stoupá přímo úměrně se zvětšujícím se objemem buňky. K uvolnění Cln3p-Cdc28p z ER a následnému přechodu buňky z G1 do S fáze tedy dochází pouze v buňkách, které již dosáhly kritické velikosti a tím hladiny Ydj1p potřebné k aktivaci Ssa1,2p (Obr. 3) (Aldea *et al.*, 2007; Vergés *et al.*, 2007).



Obrázek 3: V časně G1 fázi dochází k tvorbě a zadržení komplexu Cln3p-Cdc28p na ER. Whi3p obsahuje RNA-recognition motif (RRM), který váže mRNA *CLN3*, a Cdc28-recruitment region (CRR), který váže kinázu Cdc28p a tím i vzniklý komplex Cln3p-Cdc28p. Chaperony Ssa1,2p, inaktivované inhibiční doménou J_i cyklinu Cln3p, zadržují komplex Cln3p-Cdc28p na ER až do pozdní G1 fáze, kdy jsou aktivovány J podjednotkou proteinu Ydj1p. Aktivace Ssa1,2p působí uvolnění komplexu z ER. Následuje přechod komplexu Cln3p-Cdc28p do jádra pomocí jaderného lokalizačního signálu (NLS) na Cln3p. V jádře kináza Cdc28p fosforyluje represor Whi5p, čímž dochází k uvolnění a aktivaci transkripčních faktorů G1 specifických genů. Podle (Aldea *et al.*, 2007).

Rychlý růst a cytokineze není jedinou životní strategií kvasinkové buňky. Buňka je schopná reagovat na přítomnost živin ve svém okolí a na základě toho volit různé životní dráhy, které jí umožní přežít i nepříznivé podmínky. Jedná se například o sporulaci nebo filamentární růst. Ukázalo se, že protein Whi3p hraje při volbě životní strategie kvasinkové

buňky významnou roli. Na médiu bohatém na glukózu dochází k fosforylaci Whi3p na Ser-568, což vede k jeho inaktivaci, a buňka pak přednostně vstupuje do mitotického cyklu. Naopak na chudém médiu s nedostatkem glukózy je Whi3p aktivní a zadržuje komplex Cln3p-Cdc28p v cytoplasmě, což zabraňuje vstupu buňky do S-fáze. Delší G1 fáze vytváří podmínky pro volbu optimální strategie (Mizunuma *et al.*, 2013).

Regulace přechodu G1/S fáze buněčného cyklu pomocí Whi3p není závislá pouze na přítomnosti glukózy, ale i na přítomnosti vhodného zdroje dusíku. Kmeny s funkčním Whi3p vstupují do S fáze pouze po překročení limitní koncentrace dusíku, v opačném případě vždy volí sporulaci nebo filamentární růst. Kmeny s absencí Whi3p (*whi3Δ*) na přítomnost dusíku nejsou tolik citlivé a vstupují do S fáze i při velmi nízkých koncentracích (Wang *et al.*, 2004).

2.3 Whi3p jako regulátor ploidie

Schladebeck & Mösch (2013) zjistili, že haploidní kmeny s absencí genu *WHI3* (*whi3Δ*) vykazují po 72 denní kultivaci zvýšený počet diploidních buněk v závislosti na koncentraci živin v médiu, zatímco u kultury s funkčním Whi3p (*WHI3*) zůstává při stejně dlouhé kultivaci ploidie zachována. Je zajímavé, že diploidní kmeny *whi3Δ/whi3Δ* po stejně dlouhé kultivaci nevykazují zvýšený počet tetraploidních buněk. To je pravděpodobně způsobeno tím, že tetraploidní buňky mají sníženou životaschopnost a v populaci se tedy nevyskytují.

V tekutém minimálním médiu byl u *whi3Δ* kmenů pozorován méně výrazný nárůst ploidie, naopak největší nárůst ploidie byl pozorován na pevném bohatém médiu. Z toho vyplývá, že při udržení ploidie kvasinkových buněk hraje roli Whi3p a koncentrace živin v médiu (Schladebeck & Mösch, 2013).

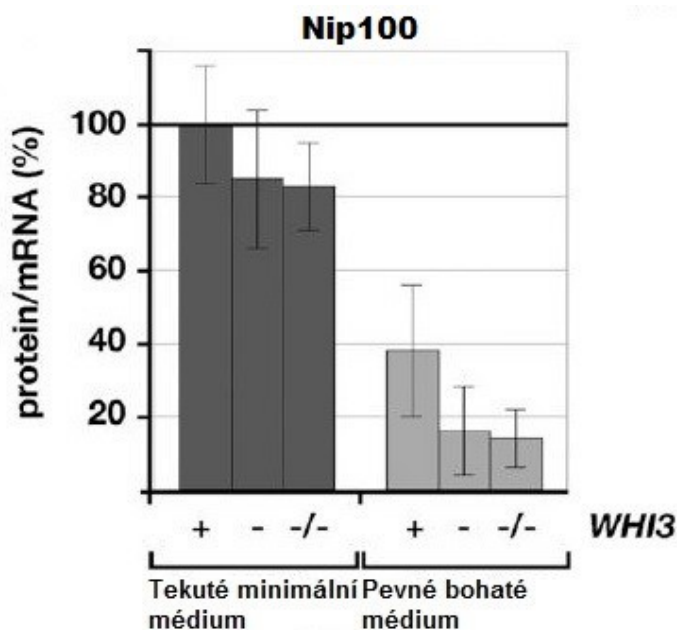
Na základě této studie byly předpovězeny dva možné způsoby, kterými Whi3p reguluje ploidii buněk.

2.3.1 Whi3p negativně reguluje expresi genů, které jsou součástí kohesinu

Haploidní kmen s delecí *WHI3* (*whi3Δ*) vykazuje mírně zvýšenou expresi genů *SMC1*, *SMC3*, *MCD1* a *IRR1*, které jsou součástí kohezinového komplexu. Je tedy pravděpodobné, že Whi3p negativně reguluje expresi těchto genů. Větší množství produktů těchto genů v buňce vede ke zvýšení soudržnosti sesterských chromatid a zabraňuje jejich rozchodu při mitóze. Tímto způsobem po rozpadu dělicího vřeténka vznikají diploidní buňky (Schladebeck & Mösch, 2013). Přímá interakce Whi3p s mRNA těchto genů není prokázána, předpokládá se regulace transkripčním komplexem Mbp1p-Swi6p-Swi4p (Schladebeck & Mösch, 2013), jehož aktivita je ovlivněna komplexem Cln3p-Cdc28p.

2.3.2 Whi3p pozitivně reguluje expresi *NIP100*

Protein Nip100p je jedním ze strukturních proteinů dynaktinu (kapitola 3.2.2), jehož absence vede ke vzniku diploidních a aneuploidních buněk v důsledku špatné orientace dělicího vřeténka (Kahana *et al.*, 1998). Whi3p interaguje s mRNA *NIP100* a reguluje tak hladinu proteinu Nip100p na posttranskripční úrovni (Costanzo, 2010). Schladebeck & Mösch (2013) kultivovali haploidní *whi3Δ* kmeny se značeným Nip100p opět na tekutém minimálním médiu a pevném bohatém médiu. Sledovali, zda-li množství proteinu Nip100p ve *whi3Δ* buňkách klesá a koresponduje tak s dříve pozorovaným zvýšením ploidie *whi3Δ* buněk rostoucích na obou médiích. Na tekutém minimálním médiu pozorovali snížené množství Nip100p v buňce cca o 20% oproti *WHI3* kmenům. Na pevném bohatém médiu však pozorovali značný úbytek již u *WHI3* kmenů. Z toho vyplývá, že množství proteinu Nip100p v buňce ovlivňuje nejen přítomnost Whi3p ale i jeho aktivita, která je závislá na množství živin v prostředí. U *whi3Δ* buněk kultivovaných na pevném bohatém médiu bylo množství Nip100p ještě třikrát menší. Jelikož v nepřítomnosti *WHI3* v buňce množství proteinu Nip100p klesá, jedná se o pozitivní regulaci (Obr. 4) (Schladebeck & Mösch, 2013).



Obrázek 4: Graf srovnávající poměr koncentrace proteinu Nip100p vůči koncentraci mRNA *NIP100* (osa y) u 3 kvasinkových kmenů: haploidní *WHI3* (+), haploidní *whi3Δ* (-) a diploidní kmen *whi3Δ/whi3Δ* (-/-) při kultivaci na médiu s nízkou koncentrací dusíku a na bohatém komplexním médiu. Při absenci Whi3p nebo snížením jeho aktivity na bohatém médiu je snížena produkce Nip100p. Podle (Schladebeck & Mösch, 2013).

2.4 Úloha Whi3p při mitotickém dělení kvasinek

Pomocí RNA-imunoprecipitace a následné identifikace RNA pomocí mikroarrayové analýzy bylo zjištěno, že Whi3p interaguje celkem s 418 mRNA různých genů, mezi které mimo jiné patří 8 z 9 cyklinů. Whi3p tedy zasahuje do průběhu celého buněčného cyklu. Kromě toho Whi3p ovlivňuje i geny/mRNA, jejichž produkty jsou nezbytné pro správný průběh mitózy u pučících kvasinek. Mezi tyto patří některé molekulární motory, podjednotky dynaktinového komplexu nebo proteiny zodpovědné za ukotvení dělicího vřeténka v kortexu pupenu. Dále se mezi nimi vyskytují i významné regulační geny obou kontrolních bodů mitózy SAC a SPOC a geny součástí signálních drah FEAR a MEN, jejichž aktivita je nezbytná pro správný průběh a ukončení mitotického dělení. Přehled vybraných genů znázorňuje Tab. 1 (Colomina *et al.*, 2008; Holmes *et al.*, 2013).

Whi3p tyto geny ovlivňuje nejčastěji na posttranskripční úrovni, což znamená, že interaguje s mRNA příslušného genu a ovlivňuje její translaci. U některých genů je však prokázána genetická interakce s Whi3p, která spočívá v regulaci exprese příslušného genu. Genetická interakce je zprostředkována tak, že Whi3p pravděpodobně ovlivňuje některý z transkripčních faktorů daného genu na posttranskripční úrovni.

Další část práce je tedy věnována vybraným procesům mitotického dělení, do kterých tyto geny zasahují.

Tabulka 1: Přehled vybraných genů v interakci s Whi3p ovlivňujících buněčný cyklus nebo karyokinezi (Colomina *et al.*, 2008; Costanzo, 2010; Holmes *et al.*, 2013).

Název	Popis	Typ interakce
APC1	Největší podjednotka APC	Protein - RNA
BUB3	Protein součástí kontrolního bodu SAC	Negativní genetická
CDC14	Fosfatáza, jejíž aktivita je důležitá pro ukončení mitózy	Protein - RNA
CDC15	Kináza součástí signální dráhy MEN	Protein - RNA
CDC28	Cyklin-dependentní kináza, hlavní regulátor mitotického a meiotického cyklu	Protein - protein
CDC55	Regulační podjednotka protein fosfatázy 2A, důležitá pro zahájení a prevenci ukončení mitózy	Protein - RNA
CLB1	Cyklin B významný v M fázi	Protein - RNA
CLB2	Cyklin B významný v M fázi	Protein - RNA/Genetická
CLB3	Cyklin B významný pro přechod G2/M fáze	Protein - RNA
CLB5	Cyklin B významný pro správný průběh S fáze	Protein - RNA
CLB6	Cyklin B významný pro správný průběh S fáze	Protein - RNA
CLN2	G1 specifický cyklin	Protein - RNA/Genetická
CLN3	G1 specifický cyklin	Protein - RNA/Genetická
KIN4	Proteinkináza (součást SPOC), která brání aktivaci MEN v buňkách s nesprávně orientovaným vřeténkem	Pozitivní genetická/Protein - RNA
KIP1	molekulární motor příbuzný kinezinu, významný pro prodlužování dělicího vřeténka pomocí polárních mikrotubulů	Protein - RNA
LTE1	GEF, inhibuje aktivitu Kin4p v pupenu	Protein - RNA
NIP100	Podjednotka dynaktinového komplexu	Pozitivní genetická
NUM1	Protein, který kotví dynein a cytoplazmatické mikrotubuly v kortexu pupenu	Protein - RNA
PAC1	Protein zajišťující lokalizaci dyneinu na + konce mikrotubulů	Protein - RNA
SWE1	Proteinkináza regulující vstup do mitózy	Protein - RNA
TEM1	GTPáza stojící na počátku signální dráhy MEN	Protein - RNA

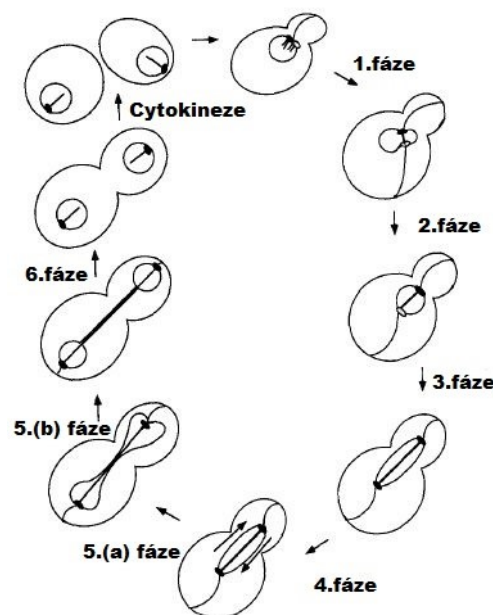
3 Dělicí vřeténko a jeho dynamika

3.1 Struktura dělicího vřeténka u kvasinek

Dělicí vřeténko je nejvýznamnější strukturou při jaderném dělení nejen u kvasinek. Skládá se ze třech typů mikrotubulů (kinetochorové, polární, astrální) vyrůstajících ze dvou pólových tělísek (SPB), které jsou během mitózy lokalizovány na jaderné membráně. Jedná se o homology centrozomů u savců. Kinetochorové mikrotubuly zajišťují vazbu chromozomů v metafázi mitotického dělení a jejich následný rozchod k pólům dělicího vřeténka v anafázi A. Polární mikrotubuly směřují od duplikovaných pólových tělísek proti sobě a vzájemně se překrývají. Tímto překryvem a pohybem molekulárních motorů Cin8p a Klp1p zprostředkovávají prodlužování dělicího vřeténka (Saunders & Hoyt, 1992). Astrální (cytoplazmatické) mikrotubuly, vystupující od pólových tělísek do cytoplasmy, se uplatňují při správné orientaci dělicího vřeténka do osy mateřská buňka-pupen a přispívají k jeho prodlužování a ukotvení v rámci dělicí se buňky. Jejich přítomnost je nezbytná pro správný průběh karyokineze. Při mutaci *tub2Δ*, genu pro β -tubulin, který je základní stavební jednotkou mikrotubulů, dochází po dělení haploidních buněk k akumulaci diploidních a aneuploidních buněk, které vznikají v důsledku špatné orientace dělicího vřeténka (Palmer *et al.*, 1992; Sullivan & Huffaker, 1992).

3.2 Dynamika dělicího vřeténka

Struktura a tvar dělicího vřeténka se v průběhu mitotického dělení mění a podle jeho morfologie můžeme rozlišit 6 odlišných morfologických stádií jádra pučící kvasinky (Obr. 5). Astrální mikrotubuly jsou přítomny v průběhu celého buněčného cyklu a na přechodu S/G2 fáze, kdy dochází k tvorbě pupenu, do něj pronikají a v důsledku své depolymerizace přitahují jádro do blízkosti krčku pupene (Shaw *et al.*, 1997). Již v rané S fázi dochází k duplikaci pólového tělíska a k migraci nově vzniklého pólového tělíska jadernou membránou na odvrácenou stranu místa pučení. Nově vzniklé pólové tělísko tedy po oddělení pupenu zůstává v mateřské buňce. Ve druhé fázi mitotického dělení probíhá orientace dělicího vřeténka do osy mateřská buňka-pupen. Třetí fáze je charakteristická rychlým prodlužováním dělicího vřeténka a čtvrtá fáze pak migrací vřeténka krčkem pupenu. V páté fázi dochází k zúžení dělicího se jádra v místě krčku pupenu a v šesté fázi dochází k centralizaci jader v rámci mateřské buňky i pupenu (Yeh *et al.*, 1995).



Obrázek 5: Schéma dynamiky dělicího vřeténka. 1. fáze – duplikace pólového tělíska; 2. fáze – vznik a orientace dělicího vřeténka do osy mateřská buňka-pupen; 3. fáze – prodlužování dělicího vřeténka; 4. fáze – migrace dělicího vřeténka do pupenu; 5. fáze – zúžení jádra v místě krčku; 6. fáze – centralizace jader v mateřské buňce i pupenu; Cytokineze – oddělení obou jader. Podle (Yeh *et al.*, 1995).

3.2.1 Molekulární motory

Vznik a dynamika dělicího vřeténka jsou procesy, které vyžadují velkou přesnost. Dělicí vřeténko je složeno převážně z mikrotubulů, tudíž se předpokládalo, že jsou jeho pohyby zprostředkované molekulárními motory, které jsou schopné se po nich pohybovat. Tento předpoklad byl správný. Bylo objeveno několik genů kódujících molekulární motory, jejichž mutace vede k poruchám při dělení jádra (Hoyt *et al.*, 1992; Roof *et al.*, 1992; Saunders *et al.*, 1995). Molekulární motory v buňce zprostředkovávají několik významných funkcí, například transport váčků či organel v rámci buňky, a také správné složení a prodlužování dělicího vřeténka při dělení (Hoyt *et al.*, 1992; Roof *et al.*, 1992; Steuer *et al.*, 1990).

Proteiny příbuzné kinezinu

Hoyt *et al.*, a Roof *et al.*, (1992) ve svých pracích specifikovali dva geny kódující proteiny příbuzné kinesinu, *KIP1* a *CIN8*, významné při dělení u kvasinek. Kip1p a Cin8p, produkty těchto genů, jsou molekulární motory, které asociují s polárními mikrotubuly dělicího vřeténka a pohybem k jejich plus konci zajišťují oddalování jeho pólů v anafázi B mitotického dělení (Saunders & Hoyt, 1992). Oba proteiny rovněž hrají významnou roli při

separaci a následné migraci pólůvých tělísek a také při tvorbě dělicího vřeténka. Kmeny nesoucí teplotně senzitivní alelu *KIP1* a bodovou mutaci v genu *CIN8* vykazují v nepříznivé teplotě specifickou morfologii. Jejich buňky mají velké pupeny, jediné jádro a duplikované pólůvé tělísko, což je fenotyp typický pro buňky zastavené v mitóze. Kmeny s delecí obou genů (*kip1Δcin8Δ*) nejsou životaschopné, nicméně kmeny mutantní pouze v jednom z těchto genů (*KIP1cin8Δ*; *kip1ΔCIN8*) jsou životaschopné a nevykazují výrazné změny ve fenotypu. Pravděpodobně tedy jde o redundantní geny (Roof *et al.*, 1992). Funkční překryv obou genů však není zcela stoprocentní, jelikož při 37°C dochází u mutantů *KIP1cin8Δ* k zastavení v mitóze. Kip1p tedy není schopen zcela nahradit funkci Cin8p při 37°C (Saunders & Hoyt, 1992).

Hladina proteinu Kip1p je regulována Whi3p.

Dynein

Dalším z molekulárních motorů významně ovlivňujících buněčné dělení je dynein. Jedná se o multipodjednotkový protein o velikosti 1,2 MDa s ATPázovou aktivitou, který je schopný pohybu k mínus konci mikrotubulů. Důležitou doménou v jeho struktuře jsou dva těžké řetězce (500 kDa), které tvoří hlavy motoru. Objevují se však i lehčí nebo střední řetězce, jejichž přítomnost/nepřítomnost vede mimo jiné k modulaci jeho funkce (Hughes *et al.*, 1995). Imunologická studie prokázala asociaci dyneinu s dělicím vřeténkem a kinetochory chromozomů, čímž byla odhalena jeho významná role při mechanismu segregace chromozomů a pohybech vřeténka u dělicích se buněk (Steuer *et al.*, 1990).

Dynein se skládá ze dvou hlavních domén. Na N konci se nachází tzv. tail doména, která zodpovídá za ukotvení dyneinu k váčkům s nákladem nebo jiným strukturám buňky. Při mitóze se tail doména váže na protein Num1p, který dynein kotví v kortexu pupenu (kapitola 3.2.3) (Markus *et al.*, 2009). Na C konci se nachází motorová doména, která má ATPázovou aktivitu, a je zodpovědná za vazbu dyneinu k mikrotubulům (King & Schroer, 2000).

Jak již bylo popsáno výše, esenciální funkci při dělení kvasinek mají astrální mikrotubuly. Jejich nepřítomnost vede k výskytu aneuploidních a diploidních buněk v důsledku špatné orientace dělicího vřeténka v rámci buňky (Palmer *et al.*, 1992). Eshel *et al.*, a Li *et al.*, (1993) objevili gen *DYNI*, kódující těžký řetězec dyneinu, jehož mutace vede k výskytu buněk vykazujících stejný fenotyp jako při absenci astrálních mikrotubulů. Na základě tohoto pozorování vyslovili hypotézu, že funkce dyneinu při mitóze souvisí s astrálními mikrotubuly. Dynein při dělení buňky zodpovídá za správnou orientaci dělicího

vřeténka a jeho translokaci do pupene. Společně s Kip1p a Cin8p dále zajišťuje separaci pólů dělicího vřeténka při anafázi B (Saunders *et al.*, 1995). Tyto funkce dyneinu byly odhaleny na základě pozorování kmenů *S. cerevisiae* s delecí *DYN1* (*dyn1Δ*). U buněk s delecí *DYN1* dělicí vřeténko nevstupuje do pupene a rozdělené chromozomy zůstávají v mateřské buňce, což vede ke vzniku diploidních a aneuploidních buněk (Yeh *et al.*, 1995).

3.2.2 Dynaktinový komplex

Dynaktin je 1,2 MDa velký vícepodjednotkový komplex, který je nezbytný pro buněčné procesy zprostředkované cytoplasmatickým dyneinem. Je mezidruhově konzervovaný, a vzhledem k jeho schopnosti interakce s mikrotubuly a různými typy nákladu, je jeho přítomnost nutná pro organizaci cytosolu téměř ve všech eukaryotických buňkách (Schroer, 2004).

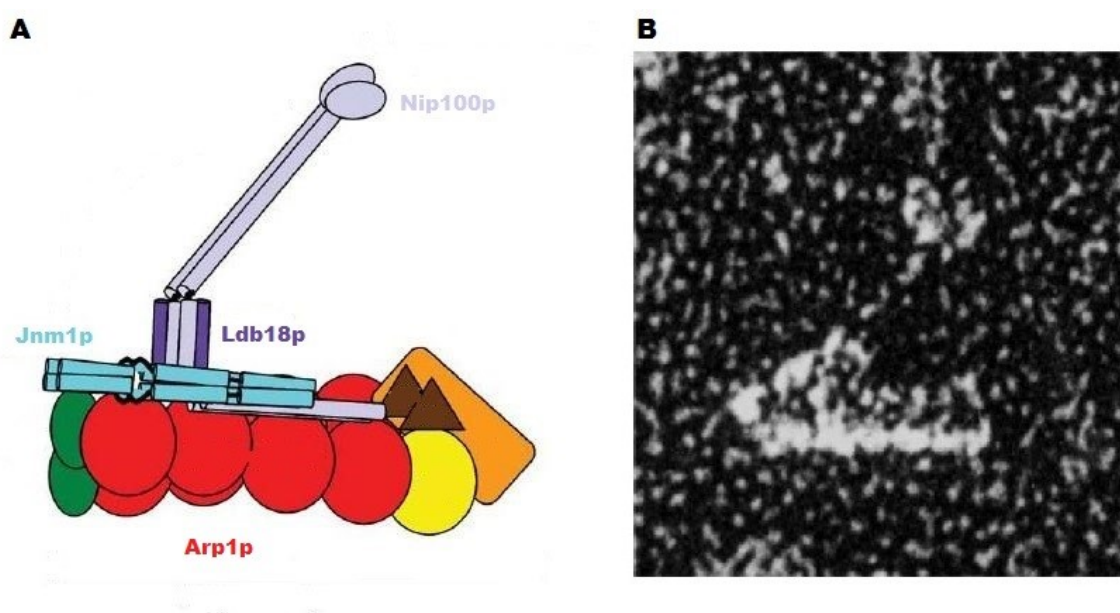
Kvasinkový dynaktin tvoří asymetrickou molekulu složenou ze dvou základních částí. První z nich je 37 nm dlouhé a 10 nm široké vlákno (Schafer *et al.*, 1994) tvořené proteinem Arp1p (u kvasinek dříve označovaným Act5p). Jedná se o homolog centraktinu u člověka, který patří do rodiny proteinů příbuzných aktinu Arp1 (Muhua *et al.*, 1994). Toto vlákno ve struktuře dynaktinu pravděpodobně přispívá k ukotvení dyneinu v kůře pupenu (Muhua *et al.*, 1994).

Druhou část dynaktinového komplexu tvoří 10 nm široké a 24 nm dlouhé rameno, které u kvasinky *S. cerevisiae* tvoří především proteiny Jnm1p, Nip100p a Ldb18p. Jnm1p je homologem dynamitinu p50 u obratlovců. Nadprodukce tohoto proteinu v buňce vede k rozpadu komplexu v důsledku vazby jedné molekuly Jnm1p s Nip100p a jiné molekuly Jnm1p s Arp1p, namísto vytvoření můstku mezi oběma proteiny. Toto pozorování dokazuje, že Jnm1p spojuje celou strukturu dynaktinu dohromady (Arp1p-Jnm1p-Nip100p) (Echeverri *et al.*, 1996; McMillan & Tatchell, 1994). Později však bylo objeveno, že k udržení struktury dynaktinového komplexu v kvasinkách významně přispívá další dynaktinová podjednotka tvořená proteinem Ldb18p, která je kvasinkovým homologem proteinu p24 u vyšších eukaryot. Ldb18p pravděpodobně tvoří můstek mezi Nip100p a Jnm1p (Arp1p-Jnm1p-Ldb18p-Nip100p) (Amaro *et al.*, 2008).

Jnm1p vytváří tzv. coiled coil strukturu, kterou se váže k poslednímu proteinu ve struktuře dynaktinového komplexu, a to k Nip100p (Schafer *et al.*, 1994). Nip100p je homologem proteinu p150^{Glued} u obratlovců a jeho přítomnost je esenciální pro funkci dynaktinu při zvýšení procesivity dyneinu, která spočívá v prodloužení vzdálenosti, jež je

dynein schopen s nákladem ujít, aniž by došlo k jeho disociaci z mikrotubulu (King & Schroer, 2000). Tuto funkci zajišťuje především pár globulárních hlav na N konci proteinu Nip100p, které se vážou na mikrotubuly (Kahana *et al.*, 1998; Schafer *et al.*, 1994), a přítomnost vazebného místa pro střední řetězec dyneinu na coiled coil struktuře tohoto proteinu (Obr. 6) (King *et al.*, 2003). Defekty spojené s absencí Nip100p byly popsány v kapitole 2.3.2.

Hladina proteinu Nip100p je regulována Whi3p.



Obrázek 6: (A) Struktura kvasinkového dynaktinového komplexu. (B) Elektronmikroskopický snímek dynaktinového komplexu. Podle (Schroer, 2004).

Kvasinkový dynaktinový komplex je na rozdíl od dynaktinu ve vyšších eukaryotech, kde hraje významnou roli při celé řadě událostí v buňce, důležitý pouze pro správnou orientaci a prodlužování dělicího vřeténka při karyokinezi. Hlavní funkcí dyneinu společně s dynaktinovým komplexem je translokace dělicího vřeténka krčkem pupene v pozdní anafázi B (Schroer, 2004). Kmeny mutantní v jednom ze strukturních proteinů dynaktinového komplexu (*nip100Δ*, *jnm1Δ*, *arp1Δ*) vykazují stejný fenotyp (nesprávná distribuce dělicího vřeténka mezi mateřskou buňkou a pupenem, selhání mitotického dělení, dvoujaderné či bezjaderné buňky) jako kmeny mutantní v genu pro těžký řetězec dyneinu (*dyn1Δ*). Z toho vyplývá, že dynein i dynaktin jsou nezbytné pro správné dělení jádra a buňky (Kahana *et al.*, 1998; McMillan & Tatchell, 1994; Muhua *et al.*, 1994).

3.2.3 Ukotvení dělicího vřeténka

Studie nejen u kvasinek, ale i v živočišných buňkách či vláknitých houbách prokazují, že správná distribuce dělicího vřeténka je podmíněná lokalizací dyneinu a dynaktinu do blízkosti plus konců astrálních mikrotubulů (Valetti *et al.*, 1999; Xiang *et al.*, 2000) a následným ukotvením celého komplexu na kortexu pupenu. Ukotvení dyneinu je totiž esenciální pro jeho aktivaci (Lee *et al.*, 2003). Otázkou tedy je, jakým způsobem se motor schopný pohybu pouze k mínus konci mikrotubulů dostává na jejich plus konce, a jak je kotven v kortexu pupenu.

PAC1

Při experimentu s tzv. *pac* mutanty (perish in the absence of *CIN8*), které nejsou životaschopné, jsou-li odstraněny současně geny *CIN8* a daný zkoumaný gen, byl objeven gen *PAC1*, který je kvasinkovým homologem genu *LIS1* u obratlovců (Geiser *et al.*, 1997). Kmeny *pac1Δ* vykazují defekty při průchodu vřeténka krčkem pupenu a při „klouzání mikrotubulů“ (kapitola 3.3). Jedná se tedy o stejný fenotyp jako při mutaci v genu pro těžký řetězec dyneinu (*dyn1Δ*), na základě čehož byla vytvořena hypotéza, že Pac1p, produkt genu *PAC1*, je součástí souboru proteinů ovlivňujících správný průběh anafáze u pučících kvasinek. Pomocí fluorescenčně značených proteinů Pac1p a Dyn1p byla tato hypotéza potvrzena a také odhalena konkrétní role proteinu Pac1p. Oba proteiny současně se v dělicích buňkách nacházejí v oblasti plus konců astrálních mikrotubulů, nicméně v případě delece v genu *PAC1* (*pac1Δ*) není nadále možné dynein v těchto místech pozorovat. Z toho vyplývá, že protein Pac1p zajišťuje lokalizaci dyneinu na plus koncích mikrotubulů. Tato závislost však není vzájemná, při deleci *DYN1* (*dyn1Δ*) je Pac1p stále asociován s distálními konci mikrotubulů. Je tedy zjevné, že pro lokalizaci obou proteinů je vyžadován pouze Pac1p (Lee *et al.*, 2003).

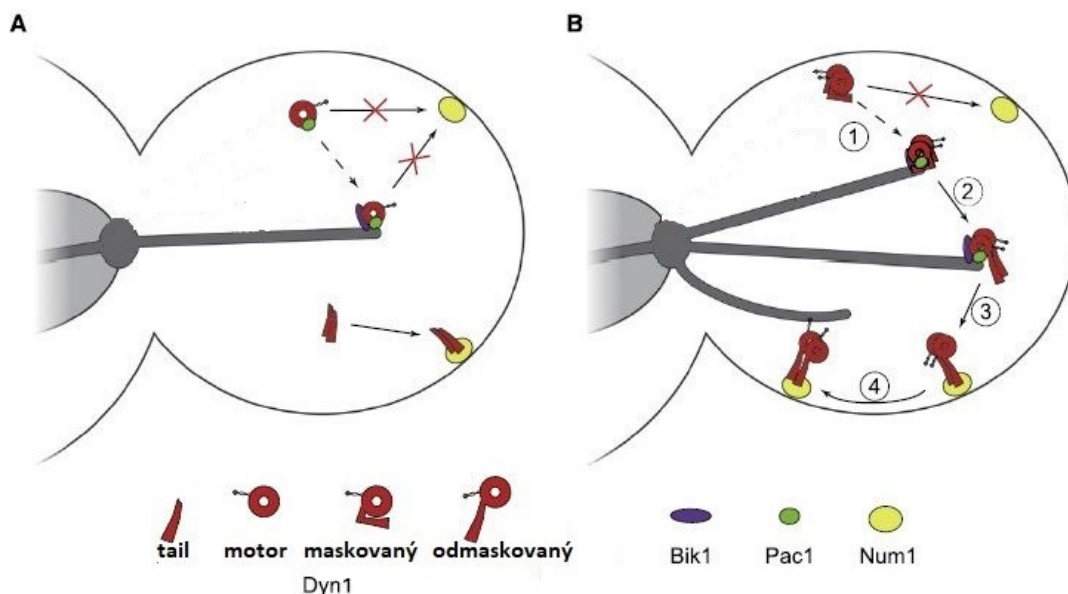
Hladina proteinu Pac1p je regulována Whi3p.

Při asociaci dyneinu s plus konci mikrotubulů hraje kromě Pac1p významnou roli protein Bik1p. Jedná se o kvasinkový homolog proteinu CLIP-170, který je vázán k plus koncům mikrotubulů. Cytoplasmatický dynein nejdříve interaguje s Pac1p a v důsledku spojení obou proteinů vzniká v této struktuře vazebné místo pro Bik1p a dochází tak k vazbě komplexu Pac1p-Dyn1p k plus konci mikrotubulů. Vazbou dyneinu na mikrotubuly by však

došlo k jeho okamžitému pohybu k mínus koncům mikrotubulů. Jelikož k tomu nedochází, je pravděpodobné, že vazba dyneinu s Pac1p působí jeho inhibici (Markus *et al.*, 2009).

Volný cytoplazmatický dynein není schopen vazby na kortex pupenu bez předešlého navázání na mikrotubuly (Markus & Lee, 2011). Markus *et al.*, (2009) odhalili mechanismus regulace lokalizace cytoplasmatického dyneinu během anafáze. Při svých pokusech použili kmeny upravené tak, aby exprimovaly pouze jednu fluorescenčně značenou doménu dyneinu (Motor-3YFP a Tail-3GFP). Proteinová doména Tail-3GFP byla v průběhu celého buněčného cyklu pozorována v kortikální oblasti buňky, zatímco doména Motor-3YFP se nacházela v oblasti pólového tělíska a v pozdní anafázi na plus koncích mikrotubulů, z čehož vyplývá, že ukotvení dyneinu v kortexu pupenu zajišťuje jeho tail doména vazbou k proteinu Num1p (Obr. 7A). Samotná doména Tail-3GFP se však nacházela na kortexu mateřské i dceřiné buňky mnohem častěji než celý Dyn1p. Toto pozorování přimělo vědce k dalšímu experimentu, kde byly použity kmeny, ve kterých bylo asociaci dyneinu s mikrotubuly zabráněno delecí *PAC1*, *BIK1* nebo rozrušením mikrotubulů působením nokodazolu. Dyn1p v těchto kmenech (*pac1Δ*, *bik1Δ*) není schopen ukotvení v kortexu. Ukotvení dyneinu v kortexu pupenu je tedy podmíněno předešlou vazbou jeho motorové domény k mikrotubulu. Skutečně, navázání motorové domény dyneinu na mikrotubuly vede ke konformační změně ve struktuře dyneinu a tzv. odmaskování tail domény, které umožňuje její vazbu k molekule proteinu Num1p (Obr. 7B) (Markus *et al.*, 2009).

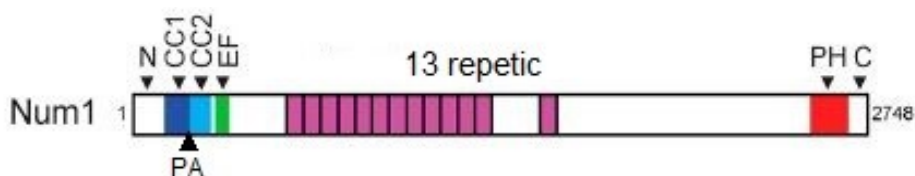
V roce 2011 byl tento maskovací mechanismus potvrzen při experimentu, kdy byl mezi motorovou a tail doménou vložen krátký peptid, čímž došlo k prodloužení krčku mezi oběma doménami. Toto prodloužení umožnilo kontakt dyneinu s kortexem ještě před jeho asociací s mikrotubuly. Vložení peptidu mezi obě domény tedy imituje konformační změnu způsobenou vazbou motorové domény na mikrotubuly a potvrzuje dříve zmiňovaný maskovací mechanismus. Nicméně se předpokládá, že nejen vazba motorové domény k mikrotubulu, ale i asociace dyneinu s dynaktinem je stěžejní událostí pro ukotvení dyneinu ke kortexu pupenu (Markus & Lee, 2011).



Obrázek 7: (A) Schéma znázorňující funkci jednotlivých domén dyneinu. Pokus s fluorescenčně značenými osamocenými doménami odhalil, že tail doména je zodpovědná za ukotvení dyneinu na kortex pupenu vazbou k Num1p, zatímco funkci motorové domény je asociace dyneinu k plus koncům astrálních mikrotubulů vazbou na proteiny Pac1p a Bik1p. (B) Schéma znázorňující ukotvení dyneinu na kortex pupenu v jednotlivých krocích. Volný cytoplasmatický dynein je nejprve navázán na plus konec astrálního mikrotubulu pomocí proteinu Pac1p a Bik1p, čímž dojde ke konformační změně a odmaskování tail domény, pomocí které je dynein uchycen na kortex pupenu vazbou proteinu Num1p. Podle (Markus *et al.*, 2009).

NUM1

Gen *NUM1* je dalším z *pac* genů (*PAC12*) (Geiser *et al.*, 1997). Produktem genu je 313 kDa velký protein Num1p (nuclear migration protein), tvořený celkem 2748 aminokyselinami. V jeho struktuře (Obr. 8) se objevuje několik domén významných pro jeho funkci. Na N konci proteinu Num1p se nachází 2 coiled coil struktury (CC1,CC2) zahrnující aminokyseliny 1-303. Společně tvoří specifickou PA (patch assembly) doménu, která je důležitá pro tvorbu proteinových ostrůvků na kortexu pupenu a pro interakci Num1p s dyneinem. Následuje tzv. EF motiv a sekvence 64 aminokyselin opakujících se ve 13 repetících, jejichž funkce není známa. Na C konci proteinu se nachází tzv. PH doména (pleckstrin homology domain) tvořená 185 aminokyselinami (Kormanec *et al.*, 1991; Tang *et al.*, 2009, 2012). PH domény jsou přítomné nejčastěji v proteinech ovlivňujících membránový transport, organizaci cytoskeletu nebo modifikace fosfolipidů. Tyto proteiny jsou díky PH doméně schopné vazby na fosfatidylinositoly přítomné v plasmatické membráně buňky (Lemmon & Ferguson, 2000)



Obrázek 8: Struktura proteinu Num1p; CC1 - coiled coil 1, CC2 - coiled coil 2, PA - patch assembly doména, PH - pleckstrin homology doména. Podle (Tang *et al.*, 2012)

Kmeny s absencí Num1p (*num1Δ*) nejsou schopné kotvit dynein, Anafáze tedy neprobíhá správně a jejich buňky jsou často dvoujaderné nebo bezjaderné. Jeho hlavní funkcí je tvorba proteinových ostrůvků na vnitřní membráně pupenu, kam se kotví dynein navázaný na plus koncích astrálních mikrotubulů. Dříve se předpokládalo, že za jejich tvorbu je zodpovědná PH doména (Farkasovsky & Küntzel, 1995). Tang *et al.* (2009) na základě toho zkoumali lokalizaci Num1p v buňce u kmenů nesoucích protein bez PH domény a přilehlých struktur (Num1ΔPH-GFP, Num1ΔC-GFP, Num1ΔPHΔC-GFP) a také lokalizaci izolované fluorescenčně značené PH domény (PH-GFP). Zjistili, že kmeny s odstraněnou PH doménou mají Num1p lokalizován volně v cytoplasmě, což potvrdilo její nezbytnost pro vazbu Num1p ke kortexu. Izolovaná PH doména však vytváří na membráně pouze dimery, zatímco většina ostrůvků je tvořena přibližně 14 molekulami tohoto proteinu. Toto pozorování vedlo k závěru, že v sekvenci Num1p musí být přítomná nějaká další doména, která zajišťuje shlukování Num1p do větších útvarů (Tang *et al.*, 2009). Podrobnou deleční analýzou genu *NUM1* identifikovali coiled coil strukturu na N konci, jejíž přítomnost je nezbytná pro vznik ostrůvků a vazbu k dyneinu. Tuto strukturu pojmenovali jako tzv. PA doménu a vytvořili komplexní model ukotvení dyneinu v kortexu buňky pomocí Num1p (Tang *et al.*, 2012).

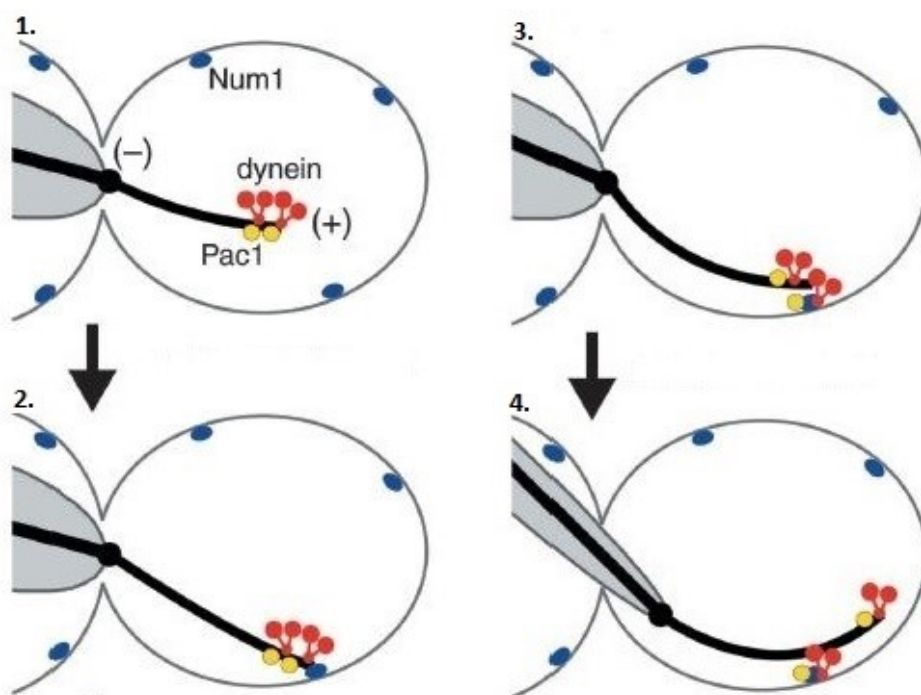
PA doména nejdříve rozpoznává specifická místa na membráně (jedná se nejčastěji o invaginace nebo výstupky). Num1p je v tomto místě ukotven vazbou PH domény na fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát a vytváří dimer. S Num1p vázaným na membráně posléze pomocí PA domény asociují další molekuly Num1p. Na takto vytvořený proteinový ostrůvek je interakcí PA domény a středního řetězce dyneinu Pac1p ukotven dynein (Tang *et al.*, 2012).

Pomocí fluorescenčně značeného Num1p byla potvrzena jeho lokalizace nejen ve vrcholu pupenu, ale také u opačného pólu mateřské buňky, kde se pravděpodobně podílí na správném průběhu telofáze (Farkasovsky & Küntzel, 2001).

Hladina proteinu Num1p je regulována Whi3p.

3.3 Model „klouzání mikrotubulů“

Během anafáze B dochází k procesu označovanému jako tzv. klouzání mikrotubulů (Obr. 9), kdy v důsledku pohybu dyneinu, kotveného v kortexu pupenu, k mínus konci astrálních mikrotubulů dochází k prodlužování dělicího vřeténka a vtažení mSPB¹ (mateřského pólového tělíska) do pupenu. V buňce je poté možno pozorovat klouzání astrálních mikrotubulů po kortexu pupenu, podle čehož byl tento jev pojmenován (Carminati & Stearns, 1997). Klouzání mikrotubulů bylo objeveno u vláknitých hub *Aspergillus nidulans* a *Neurospora crassa*, ve kterých díky němu dochází ke správné distribuci jader při hyfálním růstu (Efimov & Morris, 1998).



Obrázek 9: Dynein (červený), lokalizovaný na plus konci mikrotubulů díky vazbě s Pac1p (žlutý), je ukotven na kortexu pupenu pomocí Num1p (modrý). Vazba dyneinu k Num1p působí jeho aktivaci a pohyb k mínus koncům astrálních mikrotubulů (černé), čímž dochází k jejich klouzání po kortexu pupenu a tažení mSPB a jádra (šedé) do pupenu. Podle (Lee *et al.*, 2003).

¹ mSPB zde myšleno jako původní pólové tělísko mateřské buňky (nově vzniklé SPB po duplikaci migruje na opačnou stranu jádra, viz kapitola 3.2). Jelikož se toto SPB od okamžiku vtažení do pupenu nachází v dceřinné buňce, v další části práce je o něm hovořeno jako o dSPB (dceřinné pólové tělísko).

4 Kontrola anafáze

Whi3p váže mRNA a ovlivňuje hladinu některých proteinů (Apc1p, Bub3p, Cdc14p, Kin4p, Lte1p, Swe1p, Tem1p) viz Tab. 1 (str. 10), které jsou součástí významných regulačních drah a kontrolních bodů na konci mitózy. Kináza Swe1p reguluje vstup do mitózy. Apc1p je největší podjednotkou APC (Anaphase promoting complex) komplexu zahajujícího anafázi, protein Bub3p je součástí SAC (Spindle assembly checkpoint) kontrolního bodu sestavení dělicího vřeténka. Kináza Kin4p a protein Lte1p jsou naopak hlavními regulačními proteiny SPOC (Spindle position checkpoint) kontrolního bodu polohy dělicího vřeténka a GTPáza Tem1p stojí na počátku dráhy MEN (Mitotic exit network), která vede k ukončení mitózy (Caydasi *et al.*, 2010a). Nejvíce dějů spojených s mitotickým dělením buňky Whi3p ovlivňuje interakcí s mRNA pro fosfatázu Cdc14p, jejíž aktivita je regulována signálními drahami FEAR (Cdc fourteen-early anaphase release), což je signální dráha na počátku anafáze vedoucí k uvolnění Cdc14p, a MEN (Rock & Amon, 2009).

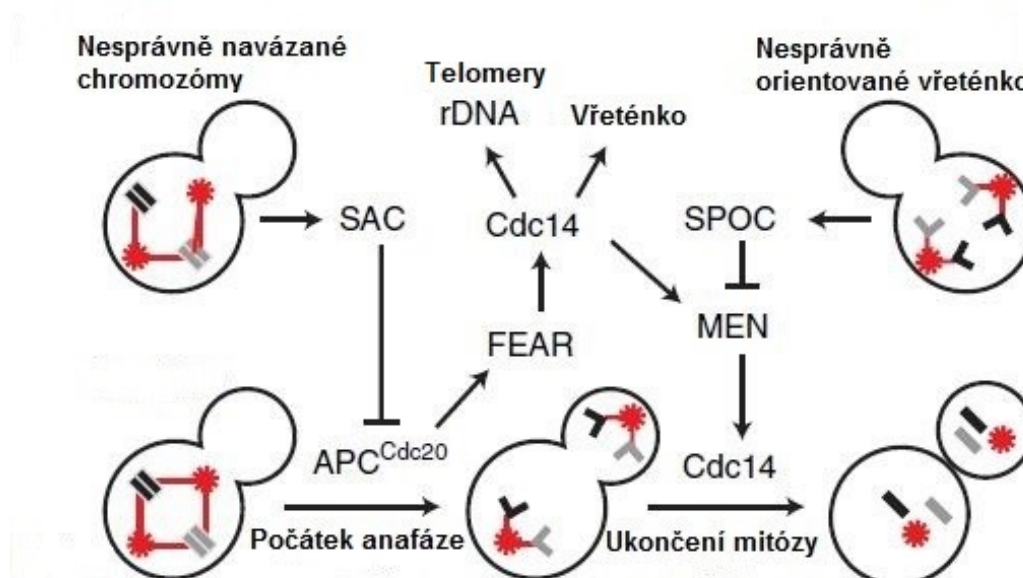
4.1 Fosfatáza Cdc14p

K ukončení mitózy je vyžadována inaktivace m-CDK (mitotická cyklin dependentní kináza), která je tvořena asociací Cdc28p s mitotickým B-cyklinem Clb2p. Za inaktivaci m-CDK je zodpovědná fosfatáza Cdc14p, která je v průběhu buněčného cyklu inhibována v jadérku vazbou na inhibitor Net1p označovaný také jako Cfi1p. K jejímu uvolnění dochází v anafázi ve dvou různých regulačních drahách.

Dráha FEAR zajišťuje její uvolnění na přechodu metafáze a anafáze. Aktivace Cdc14p touto drahou je dočasná a mírná, nicméně významná pro několik procesů v průběhu anafáze. Hlavní úlohou Cdc14p uvolněné drahou FEAR je aktivace MEN viz kapitola 4.3.2 (Caydasi *et al.*, 2010a; Stegmeier & Amon, 2004). Dále Cdc14p ovlivňuje segregaci některých repetitivních oblastí, především telomer a rDNA, pro jejichž rozdělení je nutná jejich kondenzace pomocí kondenzinu. Ke kondenzaci těchto repetitivních oblastí, narozdíl od ostatních částí genomu (metafáze), dochází až na počátku anafáze. Jelikož u mutantů ve FEAR nebo *CDC14* (*Acdd14*) jsou tyto oblasti nerozdělené, předpokládá se, že za jejich kondenzaci zodpovídá právě Cdc14p uvolněný touto drahou (D'Amours *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 2004). Kromě toho Cdc14p uvolněná drahou FEAR v pozdní anafázi až telofázi vede naopak k inaktivaci MEN, čímž urychluje přechod z M do G1 fáze (Geymonat *et al.*, 2002). Cdc14p dále ovlivňuje pozici jádra v rámci dělicí se buňky nebo vazbu některých proteinů

(Ipl1p, Sli15p), důležitých pro správnou orientaci a prodlužování dělicího vřeténka v anafázi, na polární mikrotubuly (Caydasi *et al.*, 2010a).

Na konci anafáze indukuje uvolnění veškerého množství Cdc14p signální dráha MEN. Cdc14p, uvolněná v důsledku její aktivace, defosforyluje aktivuje proteiny Sic1p, Swi5p a Cdh1p. Sic1p je specifický inhibitor m-CDK a Swi5p je jeho transkripčním faktorem. Aktivaci Swi5p je zajištěna zvýšená exprese Sic1p, čímž je umožněna efektivnější inhibice m-CDK. Cdh1p je jedním z koaktivátorů APC (kapitola 4.2.1), který při asociaci s Cdh1p ubiquitínuje cykliny B, čímž je odsuzuje k degradaci. Kromě toho samotná Cdc14p defosforyluje substráty m-CDK, což v důsledku vede k jejich přesunu do krčku, kde regulují cytokinezi a ukončení mitózy (Falk *et al.*, 2016; Visintin *et al.*, 1998).



Obrázek 10: Schéma znázorňující úlohu proteinu Cdc14p v průběhu anafáze. V případě nesprávně navázaných chromozómů na kinetochorové mikrotubuly dochází ke spuštění kontrolního bodu SAC, který inhibuje aktivitu APC. V důsledku toho nedochází k aktivaci FEAR a uvolnění Cdc14p do jádra, čímž je znemožněno dělení telomer a rDNA, prodlužování dělicího vřeténka a aktivace dráhy MEN. V případě nesprávné orientace dělicího vřeténka dochází ke spuštění kontrolního bodu SPOC, který zabraňuje aktivaci dráhy MEN a tím uvolnění Cdc14p do cytoplasmy a ukončení mitózy. Podle (Caydasi *et al.*, 2017).

4.2 Regulace průběhu mitózy v časně anafázi

4.2.1 Kontrola separace sesterských chromatid a zahájení anafáze

V metafázi mitotického dělení dochází k napojení kinetochorových mikrotubulů na kinetochory chromozómů. Správnost tohoto procesu je kontrolována tzv. „Spindle assembly checkpoint“, což je mitotický kontrolní bod, který v případě nesprávného navázání chromozómů na mikrotubuly (přítomnost volného kinetochoru, nebo vazba dvou kinetochorových mikrotubulů na jediný kinetochor) zabraňuje separaci sesterských chromatid v časně anafázi.

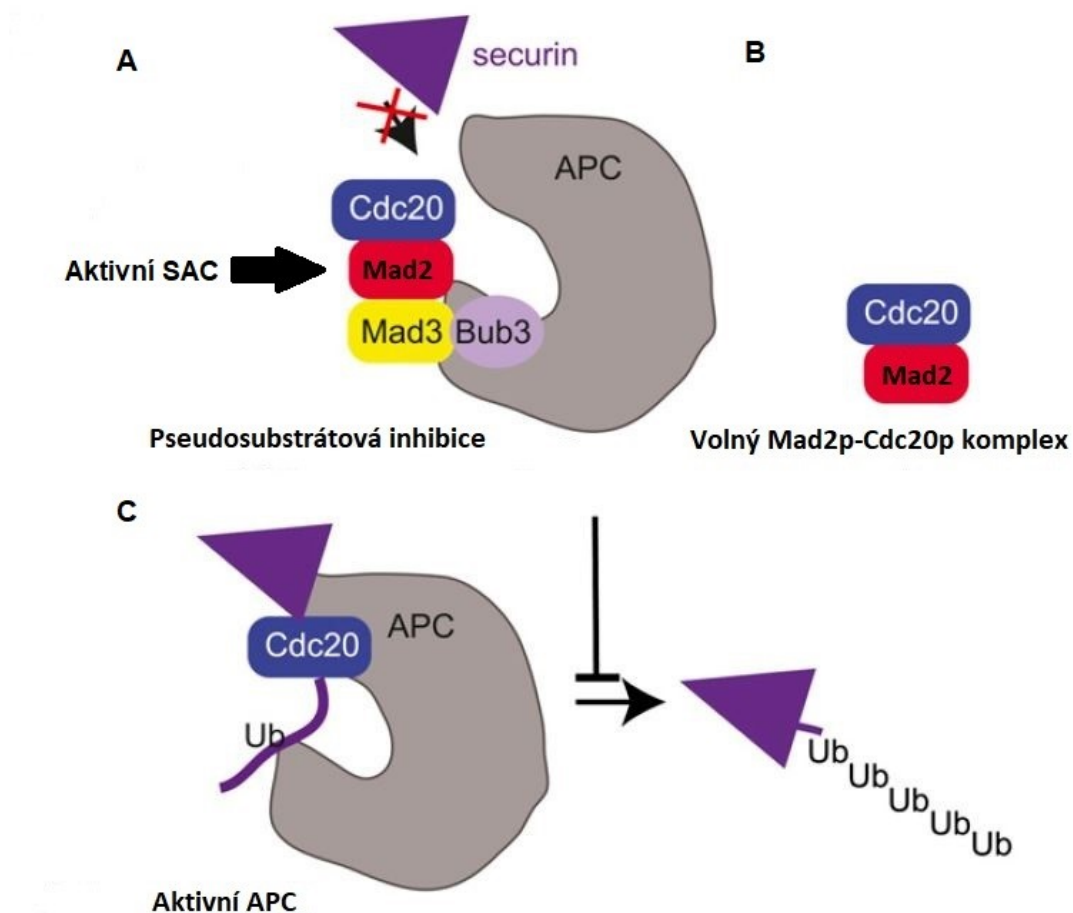
Anafázi zahajuje aktivní APC, někdy označovaný jako cyklozóm. Jedná se o 1,7 MDa velký proteinový komplex s enzymatickou aktivitou, složený z třinácti podjednotek. Protein Apc1p o velikosti 200 kDa tvoří v tomto komplexu největší strukturní podjednotku a na rozdíl od ostatních podjednotek se v komplexu nachází pouze v jedné kopii (Passmore *et al.*, 2005).

Hladina Apc1p je regulována přítomností Whi3p.

APC je E3 ubiquitin ligáza, která je schopná ubiquitinovat proteiny, čímž je určuje k degradaci v proteazomu. Aktivní APC na počátku anafáze ubiquitinuje securin Pds1p, který inhibuje separázu Esp1p. Aktivní separáza pak štěpí podjednotku kohezinu Scc1p, který propojuje sesterské chromatidy. Tím zahajuje oddalování sesterských chromatid. Aktivita APC je podmíněna jeho asociací s některým z koaktivátorů Cdc20p nebo Cdh1p. Na počátku anafáze je pro aktivitu APC nutná jeho asociace s Cdc20p a vytvoření komplexu APC-Cdc20p (Marston, 2014).

Aktivní SAC zabraňuje asociaci APC s Cdc20p vytvořením komplexu MCC (mitotic checkpoint complex), který se skládá z proteinů Mad2p, Mad3p, Bub3p a Cdc20p. Komplex MCC vytváří v APC tzv. pseudosubstrát, který stéricky brání ubiquitinaci securinu (Obr. 11). Cdc20p, který není vázán v MCC je navíc zachycen ve volném komplexu Mad2p-Cdc20p, což znemožňuje jeho další vazbu k APC. Signálem pro spuštění SAC a tvorbu MCC je pravděpodobně volný kinetochor, na který se váže protein Mad1p, který vysílá signál k vazbě Mad2p. Vazba Mad1p a Mad2p působí konformační změnu Mad2p z otevřené na zavřenou formu, která je schopna vázat Cdc20p. Na takto vytvořený komplex se poté váže Mad3p, Bub3p a Bub1p a vzniká MCC (Lara-Gonzalez *et al.*, 2012).

V okamžiku, kdy jsou již všechny chromozómy navázány správně, dochází k ukončení SAC a rozrušení MCC pravděpodobně díky autoubiquitinaci Cdc20p, která je tohoto komplexu součástí (Foster & Morgan, 2012).



Obrázek 11: Mechanismus účinku kontrolního bodu SAC. **(A)** Přítomnost volného kinetochoru vede k vytvoření MCC, který vytváří v APC tzv. pseudosubstrát, čímž znemožňuje ubiquitinaci securinu a zahájení anafáze. **(B)** Volné molekuly Cdc20p jsou vázány v komplexu Mad2p-Cdc20p, čímž je znemožněna aktivace APC. **(C)** Po správném navázání všech chromozómů dochází k ukončení SAC a aktivaci APC jeho asociací s Cdc20p. Aktivní APC ubiquitínuje securin a zahajuje anafázi. Podle (Marston, 2014).

4.2.2 FEAR

Po napojení všech chromozómů na mikrotubuly se aktivuje dráha FEAR. Iniciátorem FEAR je proteinový komplex APC (kapitola 4.2.1.), který aktivuje separázu Esp1p, jež štěpí kohezin a vytváří komplex s kinetochorovým proteinem Slk19p. Komplex Esp1p-Slk19p snižuje aktivitu Cdc55p (regulační podjednotka protein fosfatázy 2A-PP2A^{Cdc55}), která stabilizuje vazbu Cdc14p s jeho inhibitem Net1p (Cfi1p) v jadérku. Snižování aktivity Cdc55p umožňuje fosforylaci Net1p (Cfi1p) pomocí m-CDK, čímž je Cdc14p uvolněna do jádra (Obr. 15) (Rock & Amon, 2009).

Aktivita APC je regulována mechanismem SAC (Obr. 10). Tím je zajištěno, že FEAR stimuluje aktivaci Cdc14p koordinovaně se stavem dělicího vřeténka a zvyšuje se

pravděpodobnost rovnoměrné distribuce genetického materiálu. Při mutaci v genech signální dráhy FEAR se zvyšuje výskyt špatně rozdělených buněk, jelikož Cdc14p má pozitivní zpětnou vazbu na aktivitu APC. Kromě toho mají buňky s absencí FEAR i delší anafázi, jelikož Cdc14p uvolněná na počátku anafáze v rámci FEAR defosforyluje kinázu Cdc15p a protein Mob1p, které jsou součástí MEN, čímž usnadňuje její aktivaci na konci anafáze (Rock & Amon, 2009).

V současnosti je nejčastěji studovaným genem dráhy FEAR gen *SPO12*, který kóduje dosud neznámý protein (SGD, 2017). Zvýšená exprese *SPO12* potlačuje defekt mitózy u kmenů s nefunkční MEN (Stegmeier *et al.*, 2002), naopak inaktivace obou drah, např. u *spo12Δlte1Δ* je letální (Falk *et al.*, 2016). Stejný efekt jako delece *SPO12* má delece *ESPI* a *SLK19* (Obr. 15). Protein Lte1p je důležitý pro aktivaci MEN, viz dále.

4.3 Regulace průběhu mitózy v pozdní anafázi

4.3.1 Vliv polohy dělicího vřeténka – SPOC

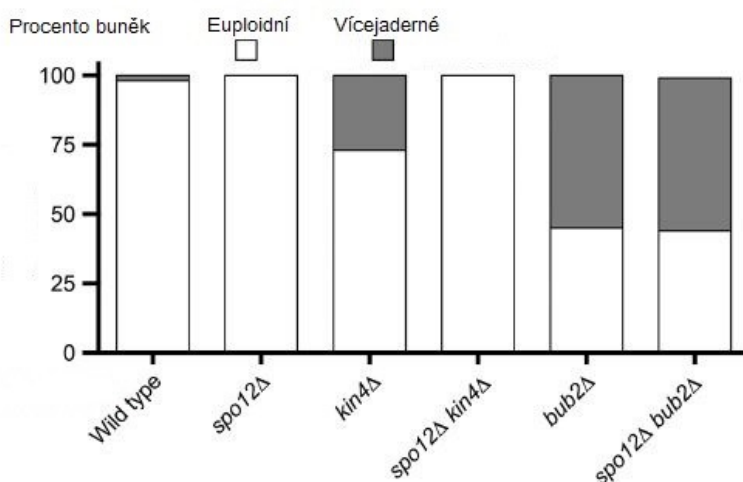
„Spindle position checkpoint“ je jedním z mechanismů, které kontrolují správný průběh anafáze mitotického dělení. V případě špatně orientovaného dělicího vřeténka (oba póly vřeténka leží uvnitř mateřské buňky) se SPOC aktivuje a zdržuje ukončení mitózy až do chvíle, kdy je vřeténko orientováno správně. Toto zajišťuje inhibicí GTPázy Tem1p, která je prvním členem dráhy MEN. Hlavními proteiny, které se účastní tohoto kontrolního bodu, jsou Kin4p, Cdc5p, Lte1p a GAP (GTPase-activating protein) komplex Bfa1p-Bub2p, který svou aktivitou inhibuje Tem1p. Protein kináza Kin4p prodlužuje anafázi u buněk s nesprávně orientovaným dělicím vřeténkem udržováním komplexu GAP v aktivním stavu. Kináza Cdc5p je antagonistou Kin4p a protein Lte1p je jejím specifickým inhibitorem (Caydasi & Pereira, 2012).

Studiem kmenů upravených tak, aby vykazovaly velké procento buněk s nesprávně orientovaným dělicím vřeténkem, byl prokázán vliv mutací genů SPOC na aktivitu MEN. Ukázalo se, že mutace genu *BUB2* (*bub2Δ*), jehož produkt je součástí komplexu GAP, působí úplnou ztrátu funkce SPOC. Tyto mutanty vykazují více než 50% dvoujaderných buněk. Prokazatelně u nich tedy dochází k aktivaci MEN a ukončení mitózy i v případě nesprávně orientovaného vřeténka.

KIN4 nebo *RTS1* deficientní kmeny (*kin4Δ*, *rts1Δ*) vykazují také zvýšený výskyt dvoujaderných buněk, avšak frekvence je nižší než u *bub2Δ*. Délka jejich anafáze je značně

prodloužena oproti kontrole, z čehož vyplývá, že při těchto mutacích je aktivita SPOC alespoň částečně zachována.

Současná delece *SPO12* (jeden z hlavních regulátorů FEAR) a *KIN4* (*spo12Δkin4Δ*) také zabraňuje ukončení mitózy u buněk se špatně orientovaným vřeténkem. Fosfatáza Cdc14p uvolněná drahou FEAR totiž přispívá k aktivaci MEN. Kvůli deleci *SPO12* se Cdc14p v časně anafázi neuvolní a delece *KIN4* je tím suprimována. Kmeny s delecí *SPO12* a *BUB2* (*spo12Δbub2Δ*) však vykazují stejný fenotyp jako kmeny *bub2Δ* (Obr. 12) (Falk *et al.*, 2016).



Obrázek 12: Graf vyjadřující procentuální zastoupení vícejaderných buněk v buňkách kmenů nesoucích mutaci v daném FEAR nebo SPOC genu. Podle (Falk *et al.*, 2016). Funkce produktů zařazených genů je popsána v kapitole 4.3.1.

Kináza Elm1p a fosfatáza Rts1p jsou dalšími proteiny důležitými pro správnou funkci SPOC. Elm1p foforyluje Kin4p, čímž aktivuje její kinázovou aktivitu. Kmeny s delecí *ELM1* (*elm1Δ*) neaktivují SPOC (Caydasi *et al.*, 2010b). Rts1p je fosfatáza, která předchází hyperfosforylaci Kin4p a zajišťuje tak její lokalizaci na mSPB v průběhu anafáze. (Chan & Amon, 2009). Mechanismus SPOC je podrobněji popsán v kapitole 4.3.2 v souvislosti s drahou MEN.

4.3.2 MEN

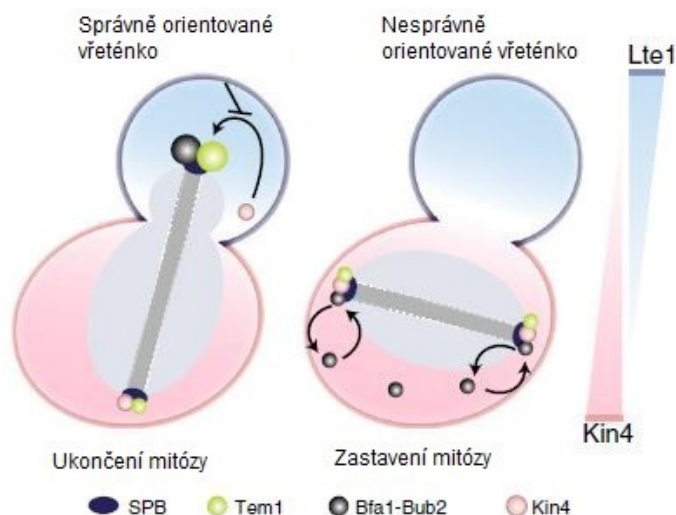
Tzv. mitotic exit network je GTPázová signální dráha, která je aktivována na konci anafáze a vede k přechodu z mitózy do G1 fáze buněčného cyklu. Probíhá na dSPB, kde jsou její prvky kotveny pomocí proteinu Nud1p. Na počátku MEN je GTPáza Tem1p, jejíž aktivita umožňuje vazbu Cdc15p k dSPB. Tato vazba aktivuje Cdc15p, která následně fosforyluje protein Dbf2p v komplexu Dbf2p-Mob1p. Takto fosforylovaný komplex přechází do jádra, kde uvolňuje Cdc14p z inhibitoru a fosforyluje její jaderný exportní signál, pomocí kterého se Cdc14p dostává do cytoplasmy, kde se nacházejí její substráty (Sic1p, Swi5p a Cdh1p) (Obr. 15) (Stegmeier & Amon, 2004).

Pro aktivaci dráhy MEN je klíčová aktivace Tem1p, která je závislá na orientaci dělicího vřeténka vůči ose mateřská buňka – pupen a rovněž na gradientech klíčových regulačních proteinů kontrolního bodu SPOC (Kin4p, Cdc5p, Bfa1p-Bub2p a Lte1p). Jejich nerovnoměrné rozmístění je regulováno vazbou astrálních mikrotubulů vycházejících z dSPB na kortex pupenu a aktivitou dyneinu.

Kináza Kin4p fosforyluje Bfa1p, čímž udržuje Bfa1p-Bub2p komplex aktivní, což znemožňuje aktivaci Tem1p. Způsobuje tak prodloužení anafáze. V pučící buňce je lokalizována převážně na kortexu mateřské buňky a na mSPB. V pupenu je inaktivována proteinem Lte1p, který se na ni váže a hyperfosforyluje, což bylo zjištěno při analýze kvasinkových kmenů, které produkují Kin4p s abnormální lokalizací v mateřské buňce i v pupenu (Kin4-S508A). Kmeny *LTE1-8N* vykazují abnormální lokalizaci proteinu Lte1p v mateřské buňce. Přítomnost Lte1p v mateřské buňce inaktivuje SPOC a frekvence vícejaderných a bezjaderných buněk je zvýšená. V buňkách s delecí *LTE1* dochází při kultivaci ve 14°C často k zastavení mitózy v pozdní anafázi. Tento defekt může být kompenzován delecí *KIN4*. Lte1p je tedy nezbytný pro regulaci aktivity Kin4p, jelikož u buněk se zvýšenou hladinou Kin4p v nepřítomnosti Lte1p dochází k silné aktivaci SPOC a zvýšené letalitě (Falk *et al.*, 2011, 2016).

Kináza Cdc5p rovněž fosforyluje Bfa1p, nicméně způsobuje naopak disociaci Bfa1p-Bub2p z Tem1p a aktivaci MEN. V buňce je distribuována rovnoměrně, nicméně je schopna fosforylovat pouze Bfa1p vázaný k dSPB umístěnému v pupenu.

K aktivaci dráhy MEN dochází díky nerovnoměrnému rozmístění těchto proteinů jen u buněk se správnou orientací vřeténka, u nichž byla zároveň aktivována FEAR (Obr. 13).



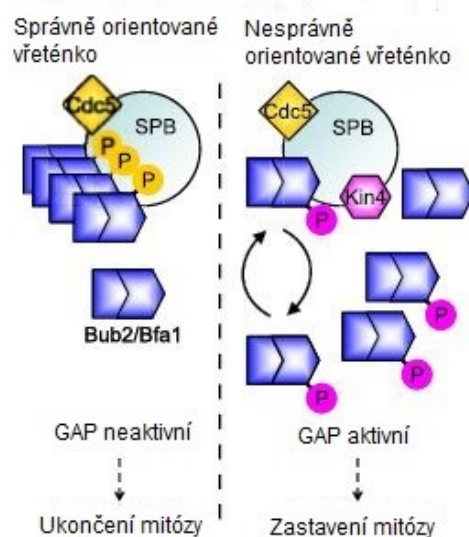
Obrázek 13: Prostorová regulace SPOC. Kin4p je schopna fosforylovat Bfa1p pouze v mateřské buňce, tzn. pouze v případě špatně orientovaného vřeténka. V důsledku fosforylace Bfa1p kinázou Kin4p dochází k vyrovnání množství komplexu Bfa1p-Bub2p a proteinu Tem1p na obou SPB. V případě správně orientovaného vřeténka k fosforylaci Bfa1p kinázou Kin4p nedochází, Kin4p je v pupenu inhibován proteinem Lte1p. Podle (Caydasi *et al.*, 2010a).

1) Průběh SPOC a MEN při správné orientaci dělicího vřeténka

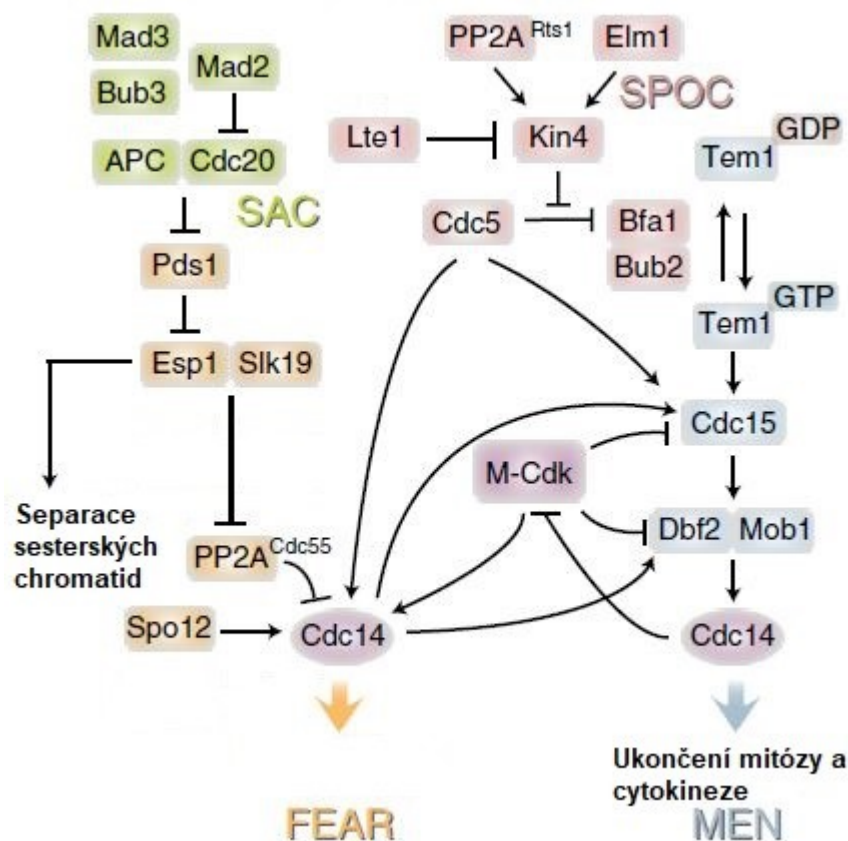
V buňkách se správně orientovaným dělicím vřeténkem se Bfa1p-Bub2p i Tem1p nacházejí ve větší koncentraci na dSPB. Bfa1p-Bub2p svou aktivitou udržuje Tem1p v inaktivované formě až do pozdní anafáze, kdy je protein Bfa1p fosforylován kinázou Cdc5p, což vede k disocaci Bfa1p-Bub2p z Tem1p a aktivaci signální dráhy MEN (Obr. 14).

2) Průběh SPOC a MEN při nesprávné orientaci dělicího vřeténka

V případě nesprávně orientovaného vřeténka se obě SPB nacházejí v mateřské buňce, což vede ke spuštění SPOC. Kináza Kin4p fosforyluje Bfa1p, tím snižuje afinitu Bfa1p k pólovému tělísku a zvyšuje dynamiku komplexu Bfa1p-Bub2p v rámci buňky. V důsledku toho dochází k vyrovnání množství Tem1p a Bfa1p-Bub2p na obou pólech dělicího vřeténka. V důsledku zvýšené dynamiky Bfa1p není Cdc5p schopna Bfa1p fosforylovat. Dráhu MEN pak nelze aktivovat a průběh mitózy je dočasně zastaven (Obr. 14) (Caydasi & Pereira, 2009; Stegmeier & Amon, 2004).



Obrázek 14: Schéma regulace SPOC. Fosforylace Bfa1p-Bub2p komplexu kinázou Cdc5p způsobuje jeho inaktivaci a vede ke spuštění MEN a ukončení mitózy. Cdc5p je schopná fosforylovat jen komplexy vázané k dceřinému pólovému tělísku. Zvýšení dynamiky tohoto komplexu v rámci buňky, způsobené fosforylací Bfa1p kinázou Kin4, znemožňuje fosforylaci komplexu kinázou Cdc5p a udržuje tak komplex aktivní, což vede k zastavení mitózy. Podle (Caydasi & Pereira, 2009).



Obrázek 15: Souhrnné schéma znázorňující interakci obou kontrolních bodů a signálních drah mitózy pučících kvasinek. Podle (Caydasi & Pereira, 2012).

5 Závěr

RNA vazebný protein Whi3p ovlivňuje velikost kvasinkové buňky při vstupu do S fáze. Novější studie prokázaly vliv tohoto proteinu i při mitotické fázi buněčného cyklu. Kmeny s delecí nebo zvýšenou expresí genu *WHI3* vykazují změny ploidie buněk, což poukazuje na defekt v mitóze. Prozatím bylo experimentálně prokázáno zvýšení ploidie v důsledku špatné orientace dělicího vřeténka nebo zvýšené soudržnosti sesterských chromatid, a to díky vlivu přítomnosti proteinu Whi3p na expresi genů, jež jsou součástí kohezinového komplexu, a na hladinu proteinu Nip100p, jež je součástí dynakinového komplexu, který má významnou roli při orientaci a ukotvení dělicího vřeténka do osy mateřská buňka-pupen. Whi3p nicméně interaguje s mnoha dalšími proteiny a mRNA genů, které ovlivňují dynamiku dělicího vřeténka nebo jsou součástí regulačních drah (FEAR, MEN) a kontrolních bodů mitózy (SAC, SPOC). Konkrétní studie, jež by poukazovaly na defekty v mitóze způsobené delecí nebo zvýšenou expresí genu *WHI3* spojené s těmito drahami dosud neexistují. Nicméně by bylo zajímavé srovnat hladinu a lokalizaci popsaných proteinů v kmenech s delecí nebo naopak zvýšenou expresí genu *WHI3* a výsledky porovnat se změnami ve fenotypu těchto kmenů. Podrobná analýza výsledků poté umožní odhalit konkrétní úlohu proteinu Whi3p v mitóze pučících kvasinek.

6 Seznam použité literatury

- Aldea, M., Garí, E., Colomina, N. (2007). Control of cell cycle and cell growth by molecular chaperones. *Cell Cycle* 6, 2599–2603.
- Amaro, I.A., Costanzo, M., Boone, C., Huffaker, T.C. (2008). The *Saccharomyces cerevisiae* Homolog of p24 Is Essential for Maintaining the Association of p150Glued With the Dynactin Complex. *Genetics* 178, 703–709.
- de Bruin, R.A., McDonald, W.H., Kalashnikova, T.I., Yates III, J., and Wittenberg, C. (2004). Cln3 Activates G1-Specific Transcription via Phosphorylation of the SBF Bound Repressor Whi5. *Cell* 117, 887–898.
- Carminati, J.L., Stearns, T. (1997). Microtubules Orient the Mitotic Spindle in Yeast through Dynein-dependent Interactions with the Cell Cortex. *J. Cell Biol.* 138, 629–641.
- Caydasi, A.K., Pereira, G. (2009). Spindle alignment regulates the dynamic association of checkpoint proteins with yeast spindle pole bodies. *Dev. Cell* 16, 146.
- Caydasi, A.K., Pereira, G. (2012). SPOC alert—when chromosomes get the wrong direction. *Exp. Cell Res.* 318, 1421–1427.
- Caydasi, A.K., Ibrahim, B., Pereira, G. (2010a). Monitoring spindle orientation: Spindle position checkpoint in charge. *Cell Div.* 5, 28.
- Caydasi, A.K., Kurtulmus, B., Orrico, M.I., Hofmann, A., Ibrahim, B., Pereira, G. (2010b). Elm1 kinase activates the spindle position checkpoint kinase Kin4. *J Cell Biol* 190, 975–989.
- Caydasi, A.K., Khmelinskii, A., Duenas-Sanchez, R., Kurtulmus, B., Knop, M., Pereira, G. (2017). Temporal and compartment-specific signals coordinate mitotic exit with spindle position. *Nat. Commun.* 8, 14129.
- Chan, L.Y., Amon, A. (2009). The protein phosphatase 2A functions in the spindle position checkpoint by regulating the checkpoint kinase Kin4. *Genes Dev.* 23, 1639–1649.
- Colomina, N., Ferrezuelo, F., Wang, H., Aldea, M., Garí, E. (2008). Whi3, a developmental regulator of budding yeast, binds a large set of mRNAs functionally related to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 283, 28670–28679.
- Colomina, N., Ferrezuelo, F., Vergés, E., Aldea, M., Garí, E. (2009). Whi3 regulates morphogenesis in budding yeast by enhancing Cdk functions in apical growth. *Cell Cycle* 8, 1912–1920.
- Costanzo, M. (2010). The Genetic Landscape of a Cell. *Science* 1180823, 327.

- D'Amours, D., Stegmeier, F., Amon, A. (2004). Cdc14 and Condensin Control the Dissolution of Cohesin-Independent Chromosome Linkages at Repeated DNA. *Cell* 117, 455–469.
- Dirick, L., Böhm, T., Nasmyth, K. (1995). Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14, 4803.
- Echeverri, C.J., Paschal, B.M., Vaughan, K.T., Vallee, R.B. (1996). Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *J. Cell Biol.* 132, 617–634.
- Efimov, V.P., Morris, N.R. (1998). A screen for dynein synthetic lethals in *Aspergillus nidulans* identifies spindle assembly checkpoint genes and other genes involved in mitosis. *Genetics* 149, 101–116.
- Falk, J.E., Chan, L.Y., Amon, A. (2011). Lte1 promotes mitotic exit by controlling the localization of the spindle position checkpoint kinase Kin4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 12584–12590.
- Falk, J.E., Campbell, I.W., Joyce, K., Whalen, J., Seshan, A., Amon, A. (2016). *LTE1* promotes exit from mitosis by multiple mechanisms. *Mol. Biol. Cell* 27, 3991–4001.
- Farkasovsky, M., Küntzel, H. (1995). Yeast Num1p associates with the mother cell cortex during S/G2 phase and affects microtubular functions. *J. Cell Biol.* 131, 1003–1014.
- Farkasovsky, M., Küntzel, H. (2001). Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules in budding yeast. *J. Cell Biol.* 152, 251–262.
- Foster, S.A., Morgan, D.O. (2012). The APC/C Subunit Mnd2/Apc15 Promotes Cdc20 Autoubiquitination and Spindle Assembly Checkpoint Inactivation. *Mol. Cell* 47, 921–932.
- Gari, E., Volpe, T., Wang, H., Gallego, C., Fitcher, B., Aldea, M. (2001). Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast. *Genes Dev.* 15, 2803–2808.
- Geiser, J.R., Schott, E.J., Kingsbury, T.J., Cole, N.B., Totis, L.J., Bhattacharyya, G., He, L., Hoyt, M.A. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* genes required in the absence of the CIN8-encoded spindle motor act in functionally diverse mitotic pathways. *Mol. Biol. Cell* 8, 1035–1050.
- Geymonat, M., Jensen, S., Johnston, L.H. (2002). Mitotic exit: the Cdc14 double cross. *Curr. Biol.* 12, R482–R484.
- Herman, I.M. (1993). Actin isoforms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 48–55.

- Holmes, K.J., Klass, D.M., Guiney, E.L., Cyert, M.S. (2013). Whi3, an *S. cerevisiae* RNA-binding protein, is a component of stress granules that regulates levels of its target mRNAs. *PloS One* 8, e84060.
- Hoyt, M.A., He, L., Loo, K.K., Saunders, W.S. (1992). Two *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related gene products required for mitotic spindle assembly. *J. Cell Biol.* 118, 109–120.
- Hughes, S.M., Vaughan, K.T., Herskovits, J.S., Vallee, R.B. (1995). Molecular analysis of a cytoplasmic dynein light intermediate chain reveals homology to a family of ATPases. *J. Cell Sci.* 108, 17–24.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J.L., Breikreutz, B.-J., Tyers, M. (2002). Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* 297, 395–400.
- Kahana, J.A., Schlenstedt, G., Evanchuk, D.M., Geiser, J.R., Hoyt, M.A., Silver, P.A. (1998). The Yeast Dynactin Complex Is Involved in Partitioning the Mitotic Spindle between Mother and Daughter Cells during Anaphase B. *Mol. Biol. Cell* 9, 1741–1756.
- King, S.J., Schroer, T.A. (2000). Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat. Cell Biol.* 2, 20–24.
- King, S.J., Brown, C.L., Maier, K.C., Quintyne, N.J., Schroer, T.A. (2003). Analysis of the dynein-dynactin interaction in vitro and in vivo. *Mol. Biol. Cell* 14, 5089–5097.
- Kormanec, J., Schaaff-Gerstenschläger, I., Zimmermann, F.K., Perecko, D., Küntzel, H. (1991). Nuclear migration in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the highly repetitive 313 kDa NUM1 protein. *Mol. Gen. Genet. MGG* 230, 277–287.
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F.G., Taylor, S.S. (2012). The Spindle Assembly Checkpoint. *Curr. Biol.* 22, R966–R980.
- Lee, C. (2013). Role of Whi3 protein aggregation behavior in cell-cycle regulation and cell polarity. DARTMOUTH COLLEGE.
- Lee, C., Zhang, H., Baker, A.E., Occhipinti, P., Borsuk, M.E., Gladfelter, A.S. (2013). Protein aggregation behavior regulates cyclin transcript localization and cell-cycle control. *Dev. Cell* 25, 572–584.
- Lee, W.-L., Oberle, J.R., Cooper, J.A. (2003). The role of the lissencephaly protein Pac1 during nuclear migration in budding yeast. *J. Cell Biol.* 160, 355–364.
- Lemmon, M.A., Ferguson, K.M. (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem. J.* 350, 1.

- Malcher, M., Schladebeck, S., Mösch, H.-U. (2011). The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 187, 717–730.
- Maris, C., Dominguez, C., Allain, F.H. (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J.* 272, 2118–2131.
- Markus, S.M., Lee, W.-L. (2011). Regulated Offloading of Cytoplasmic Dynein from Microtubule Plus Ends to the Cortex. *Dev. Cell* 20, 639–651.
- Markus, S.M., Punch, J.J., Lee, W.-L. (2009). Motor-and Tail-Dependent Targeting of Dynein to Microtubule Plus Ends and the Cell Cortex. *Curr. Biol.* 19, 196–205.
- Marston, A.L. (2014). Chromosome Segregation in Budding Yeast: Sister Chromatid Cohesion and Related Mechanisms. *Genetics* 196, 31–63.
- McMillan, J.N., Tatchell, K. (1994). The JNM1 gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is required for nuclear migration and spindle orientation during the mitotic cell cycle. *J. Cell Biol.* 125, 143–158.
- Mizunuma, M., Tsubakiyama, R., Ogawa, T., Shitamukai, A., Kobayashi, Y., Inai, T., Kume, K., Hirata, D. (2013). Ras/cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulates multiple aspects of cellular events by phosphorylating the Whi3 cell cycle regulator in budding yeast. *J. Biol. Chem.* 288, 10558–10566.
- Muhua, L., Karpova, T.S., Cooper, J.A. (1994). A yeast actin-related protein homologous to that in vertebrate dynactin complex is important for spindle orientation and nuclear migration. *Cell* 78, 669–679.
- Nash, R.S., Volpe, T., Futcher, B. (2001). Isolation and characterization of *WHI3*, a size-control gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 157, 1469–1480.
- Palmer, R.E., Sullivan, D.S., Huffaker, T., Koshland, D. (1992). Role of astral microtubules and actin in spindle orientation and migration in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 119, 583–593.
- Passmore, L.A., Booth, C.R., Vénien-Bryan, C., Ludtke, S.J., Fioretto, C., Johnson, L.N., Chiu, W., Barford, D. (2005). Structural Analysis of the Anaphase-Promoting Complex Reveals Multiple Active Sites and Insights into Polyubiquitylation. *Mol. Cell* 20, 855–866.
- Rock, J.M., Amon, A. (2009). The FEAR network. *Curr. Biol.* 19, R1063–R1068.
- Roof, D.M., Meluh, P.B., Rose, M.D. (1992). Kinesin-related proteins required for assembly of the mitotic spindle. *J Cell Biol* 118, 1.
- Saunders, W.S., Hoyt, M.A. (1992). Kinesin-related proteins required for structural integrity of the mitotic spindle. *Cell* 70, 451–458.

- Saunders, W.S., Koshland, D., Eshel, D., Gibbons, I.R., Hoyt, M.A. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-and dynein-related proteins required for anaphase chromosome segregation. *J. Cell Biol.* 128, 617–624.
- Schafer, D.A., Gill, S.R., Cooper, J.A., Heuser, J.E., Schroer, T.A. (1994). Ultrastructural Analysis of the Dynactin Complex: An Actin-related Protein Is a Component of a Filament That Resembles F-actin. *J. Cell Biol.* 126, 403–412.
- Schladebeck, S., Mösch, H.-U. (2013). The RNA-Binding Protein Whi3 Is a Key Regulator of Developmental Signaling and Ploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 195, 73–86.
- Schroer, T.A. (2004). Dynactin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 759–779.
- Shaw, S.L., Yeh, E., Maddox, P., Salmon, E.D., Bloom, K. (1997). Astral microtubule dynamics in yeast: a microtubule-based searching mechanism for spindle orientation and nuclear migration into the bud. *J. Cell Biol.* 139, 985–994.
- Stegmeier, F., Amon, A. (2004). Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu Rev Genet* 38, 203–232.
- Stegmeier, F., Visintin, R., Amon, A. (2002). Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. *Cell* 108, 207–220.
- Steuer, E.R., Wordeman, L., Schroeri, T.A., Sheetz, M.P. (1990). Localization of cytoplasmic dynein to mitotic spindles and kinetochores. *NATURE* 345.
- Stuart, D., Wittenberg, C. (1995). CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells. *Genes Dev.* 9, 2780–2794.
- Sudbery, P.E., Goodey, A.R., Carter, B.L. (1980). Genes which control cell proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 288, 401–404.
- Sullivan, D.S., Huffaker, T.C. (1992). Astral Microtubules Are Not Required for Anaphase B in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 119, 379–388.
- Sullivan, M., Higuchi, T., Katis, V.L., Uhlmann, F., Gasse, B. (2004). Cdc14 Phosphatase Induces rDNA Condensation and Resolves Cohesin-Independent Cohesion during Budding Yeast Anaphase. *Cell* 117, 471–482.
- Tang, X., Punch, J.J., Lee, W.-L. (2009). A CAAX motif can compensate for the PH domain of Num1 for cortical dynein attachment. *Cell Cycle* 8, 3182–3190.
- Tang, X., Germain, B.S., Lee, W.-L. (2012). A novel patch assembly domain in Num1 mediates dynein anchoring at the cortex during spindle positioning. *J Cell Biol* 196, 743–756.

- Tyers, M., Tokiwa, G., Futcher, B. (1993). Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J.* 12, 1955.
- Valetti, C., Wetzel, D.M., Schrader, M., Hasbani, M.J., Gill, S.R., Kreis, T.E., Schroer, T.A. (1999). Role of Dynactin in Endocytic Traffic: Effects of Dynamitin Overexpression and Colocalization with CLIP-170. *Mol. Biol. Cell* 10, 4107–4120.
- Vergés, E., Colomina, N., Garí, E., Gallego, C., Aldea, M. (2007). Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. *Mol. Cell* 26, 649–662.
- Visintin, R., Craig, K., Hwang, E.S., Prinz, S., Tyers, M., Amon, A. (1998). The Phosphatase Cdc14 Triggers Mitotic Exit by Reversal of Cdk-Dependent Phosphorylation. *Mol. Cell* 2, 709–718.
- Walsh, P., Bursać, D., Law, Y.C., Cyr, D., Lithgow, T. (2004). The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep.* 5, 567–571.
- Wang, H., Garí, E., Vergés, E., Gallego, C., Aldea, M. (2004). Recruitment of Cdc28 by Whi3 restricts nuclear accumulation of the G1 cyclin–Cdk complex to late G1. *EMBO J.* 23, 180–190.
- Xiang, X., Han, G., Winkelmann, D.A., Zuo, W., Morris, N.R. (2000). Dynamics of cytoplasmic dynein in living cells and the effect of a mutation in the dynactin complex actin-related protein Arp1. *Curr. Biol.* 10, 603–606.
- Yeh, E., Skibbens, R.V., Cheng, J.W., Salmon, E.D., Bloom, K. (1995b). Spindle dynamics and cell cycle regulation of dynein in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 130, 687–700.
- Saccharomyces Genome Database (SGD)* [online]. Stanford University, Stanford [cit. 2017-07-30]. Dostupné z: <http://www.yeastgenome.org/>